



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS
METODOLÓGICAS PARA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS COM
POTENCIAL TERAPÊUTICO PARA A TUBERCULOSE E
OUTRAS MICOBACTERIOSES**

ELIZETH DO ROSÁRIO DELGADO LOPES

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

JANEIRO 2016



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS METODOLÓGICAS
PARA AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO
PARA A TUBERCULOSE E OUTRAS MICOBACTERIOSES**

ELIZETH DO ROSÁRIO DELGADO LOPES

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

Orientadora: Professora Doutora Isabel Couto

Coorientadora: Doutora Sofia Santos Costa

O trabalho experimental desta Dissertação foi realizado na Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa

JANEIRO 2016

Os resultados apresentados nesta Dissertação foram objeto de apresentação oral em coautoria da seguinte comunicação em congresso:

Lopes, E., Costa, S. S., Machado, D., Pieroni, M., Azzali, E., Costantino, G., Viveiros, M., Couto, I. *Mycobacterium smegmatis* model for the rapid screening of new compounds with efflux inhibitory and antimycobacterial activity. Apresentação oral OC26, p. 224, in *Book of Abstracts* do Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia, MicroBiotec15, Évora, 11 de Dezembro, 2015.



Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA

O trabalho experimental desta Dissertação foi realizado no âmbito do projeto de investigação científica intitulado “NADH-menaquinona desidrogenase do tipo II (NDH-2) e a cadeia respiratória de *Mycobacterium tuberculosis*: novos alvos terapêuticos no combate à tuberculose”, com referência PTDC/BIA-MIC/121859/2010”, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia.

Agradecimentos

O desenvolvimento desta Dissertação só foi possível com o contributo e apoio de diversas pessoas, a quem aqui gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Couto, pela sua dedicação, disponibilidade, partilha de conhecimentos e pela oportunidade de realização da minha Dissertação no Laboratório de Micobactérias, um muito e reconhecido obrigado.

À minha coorientadora, Doutora Sofia Costa, pelos conhecimentos transmitidos, inteira disponibilidade, apoio e ajuda constante, sobretudo na realização do trabalho prático, um muito e reconhecido obrigado.

Ao Professor Doutor Miguel Viveiros, pelas aulas lecionadas, que muito contribuíram para o meu interesse em desenvolver a minha Dissertação em micobactérias.

À Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia Médica, pelas condições de trabalho disponibilizadas. Gostaria de agradecer à Marta Gabriel, ao Jorge Ramos e à Ana Armada pela constante disponibilidade em ajudar e especialmente à Diana Machado e à Laura Fernandes, pela ajuda e apoio.

Ao Doutor Marco Pieroni, do Dipartimento di Farmacia, Università degli studi di Parma, Parma, Itália, pelo desenho e síntese dos compostos, Q-15.252, EA156 e EA160, utilizados neste trabalho.

Ao corpo docente do VI Mestrado em Microbiologia Médica, que ao longo destes dois anos muito acrescentou à minha formação em Microbiologia.

Aos colegas de mestrado, especialmente à Ana Sofia Simões e à Ana Sofia Eusébio, pela amizade e pelos bons momentos proporcionados.

À minha família, principalmente aos meus pais pelo amor e dedicação e às minhas irmãs, pela amizade e apoio incondicional.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta dissertação, um Muito Obrigado!

Resumo

A multirresistência aos antibióticos em micobactérias, em particular *Mycobacterium tuberculosis*, é hoje um problema de saúde pública global. Atualmente, para além da ocorrência de mutações, o efluxo de antibióticos é considerado um importante fator no desenvolvimento de resistência, abrindo novas perspectivas no desenho de esquemas terapêuticos para as infeções causadas por estirpes resistentes, nomeadamente pela combinação de antibióticos e inibidores de efluxo.

Nesta Dissertação, foi desenhado um modelo para rastreio e identificação de compostos com atividade antimicobacteriana e/ou inibitória de efluxo, usando duas estirpes isogénicas de *Mycobacterium smegmatis*; mc²155 (estirpe selvagem) e XZL1675 (mc²155 Δ lfrA), que diferem entre si na capacidade de efluxo, devido à deleção parcial da bomba de efluxo LfrA. Neste modelo, os compostos são avaliados através da determinação da sua concentração mínima inibitória (CMI) e da capacidade, a uma concentração subinibitória, de redução de CMIs de antibióticos e brometo de etídio (EtBr). Os compostos com CMIs baixas (20 μ M) são classificados como potenciais antimicobacterianos, enquanto aqueles capazes de reduzir ($\geq 4x$) a CMI de outros compostos são classificados como potenciais adjuvantes. Dentro destes, a redução da CMI do EtBr, um substrato comum de bombas de efluxo, em conjunto com ensaios fluorométricos, são utilizados para distinguir potenciais inibidores de efluxo. Efeitos de sinergismo entre os restantes potenciais adjuvantes e os antibióticos são avaliados por ensaios de “checkerboard”.

O modelo foi testado utilizando os compostos de referência clorpromazina, tioridazina e verapamil. Como esperado, o verapamil demonstrou ser o inibidor de efluxo mais eficaz, enquanto a clorpromazina e tioridazina apresentaram atividade antimicobacteriana e de inibição de efluxo moderadas. De seguida, o modelo foi aplicado a três novos compostos, um fenilimidazolo (Q-15.252), que apresentou apenas atividade antimicobacteriana moderada e dois tiazóisoxazolos (EA156 e EA160), que apresentaram atividade inibitória de efluxo, que no caso de EA160, foi superior à do verapamil.

Em conclusão, o modelo desenhado permite um rastreio rápido e económico de um elevado número de compostos em condições de biossegurança e a identificação de potenciais antimicobacterianos ou inibidores de efluxo, como o composto EA160.

Abstract

Drug resistant mycobacteria, particularly *Mycobacterium tuberculosis*, are major challenges to global public health. Besides mutation, efflux is now being recognized as a major driving force towards development of resistance to antibiotics in mycobacteria. This demands for alternative therapeutic regimens to fight infections caused by resistant strains, such as the combination of antibiotics and efflux inhibitors.

In this work, we build a model for the rapid screening and identification of compounds with antimycobacterial and/or efflux inhibitory activity, using two isogenic strains of the fast growing *Mycobacterium smegmatis*; mc²155 (wild-type) and XZL1675 (mc²155 Δ *lfrA*), which differ in efflux capacity due to a partial deletion of the LfrA efflux pump. In this model, compounds are first evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) determination and assessment of their ability, at a sub-inhibitory concentration, to reduce MICs of antibiotics and ethidium bromide (EtBr). Compounds showing low MICs (20 μ M) are categorized as potential antimycobacterials, while those able to promote MIC reductions (\geq 4-fold) of other agents are classified as potential adjuvants. Within these, reduction of the MIC of EtBr, a common substrate of efflux systems, together with efflux fluorometric assays are used to distinguish potential efflux inhibitors. Synergy between the other adjuvants and antibiotics is evaluated by checkerboard assays.

The model was tested with the reference compounds chlorpromazine, thioridazine and verapamil. As expected, verapamil showed the highest efflux inhibitory activity, whereas chlorpromazine and thioridazine showed moderate antimycobacterial activity and efflux inhibitory capacity.

We then applied the model to three new compounds; a phenylimidazole (Q-15.252), and two thiazisoxazoles (EA156 and EA160). Compound Q-15.252 presented mild antimycobacterial activity but no adjuvant effect, whereas the molecules EA156 and EA160 showed significant efflux inhibitory capacity, particularly EA160.

In sum, the experimental model developed allows the rapid and inexpensive screening of high number of compounds in biosafety conditions and to identify potential new antimycobacterials or efflux inhibitors, such as EA160.

ÍNDICE

Comunicação em congresso	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais do género <i>Mycobacterium</i>	1
1.1.1 Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.1.2 Micobactérias não tuberculosas	2
1.2 Epidemiologia da tuberculose e outras micobacterioses	2
1.3 Antibióticos utilizados no combate à tuberculose e outras micobacterioses	4
1.4 Mecanismos de resistência aos antibióticos	5
1.5 Sistemas de efluxo	7
1.5.1 Superfamília “ATP-binding cassette” (ABC).....	8
1.5.2 Superfamília “major facilitator” (MFS)	8
1.5.3 Família “resistance-nodulation-cell division” (RND)	9
1.5.4 Família “small multidrug resistance” (SMR)	9
1.5.5 Família “multidrug and toxic compound extrusion family” (MATE).....	9
1.6 Bombas de efluxo em micobactérias.....	10
1.7 Sistema de efluxo LfrA de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	13
1.8 Inibidores de efluxo (IEs)	14
1.8.1 Fenotiazinas	14
1.8.2 Verapamil (VP).....	15
1.9 Avaliação da atividade de efluxo por fluorometria.....	16
1.10 Objetivos.....	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS	19

2.1 Materiais	19
2.1.1 Estirpes bacterianas	19
2.1.2 Outro material biológico.....	19
2.1.3 Meios de cultura	20
2.1.4 Reagentes e soluções	21
2.2 Métodos	23
2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas	23
2.2.2 Análise da sequência nucleotídica do gene <i>lfrA</i>	24
2.2.2.1 Extração de DNA genómico.....	24
2.2.2.2 Análise do gene <i>lfrA</i>	24
2.2.3 Análise da expressão de genes codificantes para bombas de efluxo	26
2.2.3.1 Extração de RNA total.....	26
2.2.3.2 Análise de expressão génica por RT-qPCR.....	27
2.2.4 Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI).....	28
2.2.4.1 Preparação do inóculo	28
2.2.4.2 Determinação de CMIs dos antibióticos e EtBr	28
2.2.4.3 Determinação de CMIs dos inibidores de efluxo (IEs) e dos novos compostos	30
2.2.5 Avaliação do efeito dos IEs/novos compostos sobre o valor de CMIs de antibióticos e EtBr	30
2.2.6 Ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”	31
2.2.7 Ensaios de fluorimetria em tempo-real.....	32
2.2.7.1 Ensaios de acumulação.....	34
2.2.7.1.1 Preparação do inóculo	34
2.2.7.1.2 Ensaios de acumulação de EtBr.....	34
2.2.7.1.3 Ensaios de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo/novos compostos	34
2.2.7.2 Ensaios de efluxo.....	35
3 RESULTADOS.....	37
3.1 Análise do gene <i>lfrA</i> da estirpe <i>M. smegmatis</i> XZL1675.....	37

3.2	Análise da expressão de genes codificantes para bombas de efluxo.....	38
3.3	Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMI)	39
3.4	Avaliação do efeito dos inibidores de efluxo sobre o valor de CMI de antibióticos e EtBr.....	40
3.5	Ensaio de sinergismo pelo método de “Checkerboard”.....	43
3.6	Avaliação da atividade de efluxo por fluorimetria.....	49
3.6.1	Ensaio de acumulação de EtBr.....	49
3.6.2	Ensaio de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo	50
3.6.3	Ensaio de efluxo.....	52
3.7	Construção de um modelo de rastreio de novos compostos com potencial atividade antimicrobiana e/ou inibitória de efluxo	53
3.8	Aplicação do modelo para a avaliação de novos compostos.....	56
3.8.1	Determinação de CMI dos novos compostos.....	56
3.8.2	Determinação de CMI de antibióticos e EtBr na presença dos novos compostos	57
3.8.3	Ensaio de acumulação de EtBr na presença dos novos compostos.....	58
3.8.4	Ensaio de efluxo.....	61
4	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	62
4.1	Caracterização das estirpes <i>M. smegmatis</i> mc²155 e XZL1675.....	63
4.1.1	Análise do sistema de efluxo LfrA	63
4.1.2	Análise da expressão de genes codificantes para bombas de efluxo	64
4.1.3	Perfil de suscetibilidade das estirpes	66
4.1.4	Avaliação do efeito dos inibidores de efluxo sobre o valor de CMI dos antibióticos e EtBr	67
4.2	Construção e otimização do modelo de rastreio.....	68
4.3	Aplicação do modelo na avaliação de novos compostos	71
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

Índice de Figuras

Figura 1. Incidência global da tuberculose em 2014	3
Figura 2. Representação esquemática das cinco famílias de bombas de efluxo associadas a multirresistência em bactérias	7
Figura 3. Estruturas químicas da clorpromazina e da tioridazina.....	15
Figura 4. Estrutura química do verapamil	16
Figura 5. Ensaio de acumulação de EtBr para a estirpe <i>M. smegmatis</i> mc ² 155, na ausência e presença do inibidor de efluxo verapamil.	17
Figura 6. Ensaio de efluxo do EtBr para a estirpe <i>M. smegmatis</i> mc ² 155, na presença de glucose e glucose com inibidor de efluxo verapamil	17
Figura 7. Representação esquemática da preparação de placas de 96 poços para determinação de CMIs pelo método de microdiluição em meio líquido	28
Figura 8. Representação esquemática da preparação de placas de 96 poços para ensaios de sinergismo pelo método de “checkerboard”	32
Figura 9. Aspetto exterior de um aparelho Rotor-Gene TM 3000 e representação esquemática do seu interior.....	33
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR de um fragmento do gene <i>lfrA</i> e dos respetivos fragmentos obtidos após purificação	37
Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína LfrA das estirpes <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 e XZL1675.....	38
Figura 12. Representação gráfica do efeito exercido pelos três inibidores de efluxo sobre os valores de CMIs da eritromicina, claritromicina e brometo de etídio, para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i> em estudo	43
Figura 13. Representação gráfica do efeito exercido pelos três inibidores de efluxo sobre os valores de CMIs da ciprofloxacina, ofloxacina e estreptomicina para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i> em estudo.	45
Figura 14. Representação gráfica do efeito exercido pelos três inibidores de efluxo sobre os valores de CMIs da rifampicina, isoniazida e etambutol para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i> em estudo.....	47
Figura 15. Ensaio de acumulação com concentrações crescentes de EtBr na ausência e presença de glucose para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i>	50

Figura 16. Ensaio de acumulação de EtBr para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i> na presença de inibidores de efluxo e na ausência e presença de glucose.....	51
Figura 17. Ensaios de efluxo de EtBr na presença dos inibidores de efluxo e na ausência e presença de glucose para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i>	53
Figura 18. Fluxograma representando o modelo de rastreio e identificação de novos compostos	54
Figura 19. Ensaio de acumulação de EtBr para a estirpe mc ² 155, na presença de inibidores de efluxo e dos novos compostos Q-15.252, EA156 e EA160, na ausência e presença de glucose	58
Figura 20. Ensaio de acumulação de EtBr na presença do novo composto EA160 na ausência e presença de glucose para a estirpe mc ² 155	59
Figura 21. Ensaio de efluxo de EtBr na presença dos inibidores de efluxo e dos novos compostos EA156 e EA160 na ausência e presença de glucose para a estirpe mc ² 155.....	61
Figura 22. Estrutura bidimensional do sistema de efluxo LfrA em <i>M. smegmatis</i>	63

Índice de Tabelas

Tabela 1. Mecanismos de ação dos principais antibióticos utilizados no tratamento de tuberculose e outras micobacterioses e principais mecanismos de resistência mutacionais aos mesmos.....	6
Tabela 2. Bombas de efluxo identificadas e caracterizadas em micobactérias.....	12
Tabela 3. Estirpes de <i>M. smegmatis</i> utilizadas neste trabalho	19
Tabela 4. Sequências nucleotídicas dos “primers” utilizados neste trabalho	20
Tabela 5. Composição dos meios de cultura e suplemento utilizados neste trabalho....	21
Tabela 6. Composição e preparação das soluções “stock” dos antibióticos, EtBr e inibidores de efluxo utilizados neste trabalho.....	21
Tabela 7. Composição e preparação das soluções “stock” dos novos compostos	22
Tabela 8. Composição e preparação de outras soluções utilizadas neste trabalho	23
Tabela 9. Gama de concentrações testadas dos agentes antimicrobianos em estudo	29
Tabela 10. Gama de concentrações testadas dos inibidores de efluxo e novos compostos em estudo	30
Tabela 11. Quantificação da expressão de genes codificantes para bombas de efluxo na estirpe <i>M. smegmatis</i> XZL1675	39
Tabela 12. Valores de CMIs dos antibióticos e EtBr para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i> utilizadas neste trabalho	39
Tabela 13. Valores de CMIs dos inibidores de efluxo para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i> e concentrações utilizadas nos ensaios de sinergismo e fluorometria	40
Tabela 14. Valores de CMIs dos antibióticos e EtBr para a estirpe mc ² 155 na presença dos inibidores de efluxo	41
Tabela 15. Valores de CMIs dos antibióticos e EtBr para a estirpe XZL1675 na presença dos inibidores de efluxo	42
Tabela 16. Efeito dos inibidores de efluxo nos valores de CMIs da eritromicina, claritromicina e EtBr e respectivos valores de FIC para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i> em estudo	44

Tabela 17. Efeito dos inibidores de efluxo nos valores de CMIs da ciprofloxacina, ofloxacina e estreptomicina e respectivos valores de FIC para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i> em estudo	46
Tabela 18. Efeito dos inibidores de efluxo nos valores de CMIs da rifampicina, isoniazida e etambutol e respectivos valores de FIC para as duas estirpes de <i>M. smegmatis</i> em estudo	48
Tabela 19. Valores de RFF dos inibidores de efluxo na ausência e presença de glucose para as duas estirpes.....	52
Tabela 20. Valores de CMIs dos novos compostos para a estirpe de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 e concentrações usadas nos ensaios de sinergismo e fluorometria...	56
Tabela 21. Valores de CMIs dos antibióticos e EtBr na presença do composto Q-15.252 para a estirpe mc ² 155	57
Tabela 22. Valores de RFF dos novos compostos e dos inibidores de efluxo e na ausência e presença de glucose para a estirpe mc ² 155	59
Tabela 23. Valores de RFF do composto EA160 na ausência e presença de glucose para a estirpe mc ² 155.....	60
Tabela 24. Classificação e identidade de potenciais bombas de efluxo em <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e respectivos homólogos em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	65

Lista de abreviaturas

A – adenina

ABC – “ATP-binding cassette”

ATCC – “American Type Culture Collection” (Teddington, Reino Unido)

ATP – adenosina trifosfato, do inglês “adenosine triphosphate”

C – citosina

CIP – ciprofloxacina

CLR – claritromicina

CLSI – “Clinical and Laboratory Standards Institute” (Wayne, PA, E.U.A)

CMI – concentração mínima inibitória

CPZ – clorpromazina

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”

dNTPs – desoxirribonucleótidos trifosfatados

DO – densidade ótica

EMB – etambutol

ERY – eritromicina

EtBr – brometo de etídio, do inglês “ethidium bromide”

FIC – concentração inibitória fracionária, do inglês “fractional inhibitory concentration”

FICI – índice de concentração inibitória fracionária, do inglês “fractional inhibitory concentration index”

G – guanina

IE – inibidor de efluxo

INH – isoniazida

MATE – “multidrug and toxic compound extrusion”

MDR – multirresistência a diversos compostos, do inglês “multidrug resistant”

MDR-TB – tuberculose multirresistente, do inglês “multidrug resistant tuberculosis”

MFS – “major facilitator superfamily”

OFX – ofloxacina

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – tampão fosfato salino, do inglês “phosphate buffered saline”
PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês “polymerase chain reaction”
RFF – fluorescência relativa final, do inglês “relative final fluorescence”
RIF – rifampicina
RNA – ácido ribonucleico, do inglês “ribonucleic acid”
RND – “resistance-nodulation-cell division”
RT-qPCR – transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase quantitativa, do inglês “reverse transcription- quantitative polymerase chain reaction ”
SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida
SMR – “small multidrug resistance”
STR – estreptomicina
T – timina
TZ – tioridazina
VIH – vírus da imunodeficiência humana
VP – verapamil
XDR-TB – tuberculose extensivamente resistente, do inglês “extensively drug resistant tuberculosis”

Lista de Unidades

µg – micrograma; mg – miligrama; g – grama
µL – microlitro; mL – mililitro; L – litro
nm – nanômetro; µm – micrómetro
pb – par de bases; kb – kilobase
pmol – picomol
µM – micromolar
rpm – rotações por minuto
V – volt
°C – grau Celsius

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do género *Mycobacterium*

O género *Mycobacterium* foi descrito por Lehmann e Neumann em 1896 no qual incluíram apenas duas espécies, *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* [122]. Atualmente, engloba mais de 150 espécies e subespécies [44], compreendendo bactérias álcool-ácido resistentes que possuem na parede celular ácidos micólicos com 60 a 90 átomos de carbono e que apresentam um alto teor de guanina e citosina no seu DNA (61 a 71 mol%), à exceção de *M. leprae* (54 a 57 mol%) [64]. As micobactérias apresentam uma forma bacilar, com 1 a 10 µm de comprimento e 0,2 a 0,6 µm de largura, são imóveis, não esporuladas e aeróbias, embora algumas espécies sejam microaerofílicas [9].

Este género é composto pelo complexo *M. tuberculosis*, por *M. leprae* e pelo grupo das micobactérias não tuberculosas, onde está incluído o complexo *Mycobacterium avium* e outras micobactérias [15].

1.1.1 Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é formado pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. orygis* e *Mycobacterium mungi* [64, 142]. Estas espécies são estritamente relacionadas, apresentando 99,95 % de identidade ao nível do genoma. Contudo, diferem entre si no tropismo pelo hospedeiro, fenótipo e patogenicidade [116]. A espécie *M. tuberculosis* é o principal agente etiológico da tuberculose humana, embora *M. africanum* também possa causar esta patologia em humanos. As restantes espécies deste complexo são agentes etiológicos de tuberculose em outras espécies animais, tal como *M. bovis*, responsável pela tuberculose bovina. No entanto, já foram reportados casos de tuberculose humana causados por estas espécies, geralmente associados a transmissão zoonótica [15, 83].

1.1.2 Micobactérias não tuberculosas

O grupo das micobactérias não tuberculosas abrange mais de 150 espécies ubíquas que podem ser responsáveis por infecções oportunistas em humanos, como *M. avium*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. ulcerans*, *M. chelonae* e *M. abscessus*, exibindo patogenicidade variada, incluindo infecções pulmonares e cutâneas, linfadenites, entre outras [55, 64, 121]. Neste grupo está abrangido o complexo *Mycobacterium avium*, que inclui *M. avium* e *M. intracellulare*, importantes agentes patogênicos em pacientes imunocomprometidos, principalmente doentes com VIH/SIDA (vírus da imunodeficiência humana/ síndrome da imunodeficiência adquirida) [28, 41].

A espécie *M. smegmatis* pertence igualmente ao grupo das micobactérias não tuberculosas, tendo sido isolada pela primeira vez em 1885 por Lustgarten [125]. Esta é uma espécie saprófita, de crescimento rápido e raramente patogénica. No entanto, pode estar associada a linfadenites, celulites, osteomielite, infecções do esterno após cirurgias cardíacas, bacteriemia derivada da colocação de cateter intravenoso e abscesso de mama após mamoplastia de aumento [18, 48, 125]. Em oposição a *M. tuberculosis* e outras micobactérias, *M. smegmatis* é facilmente cultivável em laboratório, com formação de colónias em 3 a 5 dias, dependendo do meio de cultura [70, 125].

1.2 Epidemiologia da tuberculose e outras micobacterioses

A tuberculose é transmitida por inalação de aerossóis contendo bacilos provenientes de um doente com tuberculose pulmonar ativa. Os bacilos atingem os alvéolos pulmonares, onde são fagocitados e geralmente o sistema imunológico é capaz de os conter havendo a formação de um granuloma (infecção latente). Porém, em alguns casos, pode ocorrer uma multiplicação dos bacilos, havendo uma progressão para tuberculose pulmonar ativa. Embora a tuberculose atinja maioritariamente os pulmões, certas formas de tuberculose podem progredir para tuberculose miliar através da disseminação hematogénea de bacilos [51, 118].

A tuberculose é uma doença de notificação obrigatória e a primeira causa de morte por doenças infecciosas. Estima-se que um terço da população mundial esteja infetada com *M. tuberculosis* (infecção latente). Em 2014, foram reportados 9,6 milhões de novos casos

de tuberculose e 1,5 milhões de mortes associadas a esta doença (Figura 1) [88]. Estima-se que em 2014, 3,3 % de novos casos de tuberculose e 20 % de casos de tuberculose anteriormente tratados tenham desenvolvido multirresistência (MDR-TB, causada por bacilos simultaneamente resistentes à isoniazida e à rifampicina, os dois principais fármacos de primeira linha), sendo que em média, 9,7 % dos doentes com MDR-TB desenvolveram tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB, correspondente a casos de MDR-TB adicionalmente resistentes a pelo menos uma fluoroquinolona e a um agente antimicrobiano de segunda linha injetável) [88].

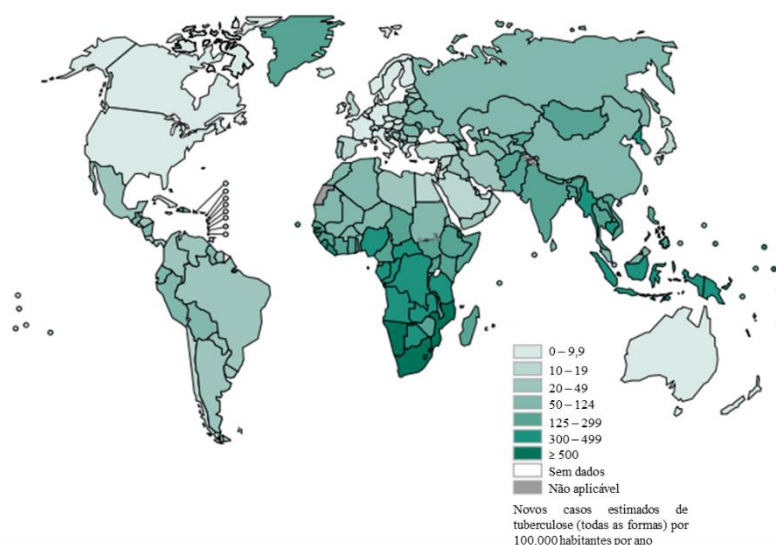


Figura 1. Incidência global da tuberculose em 2014. Número de novos casos por 100.000 habitantes por ano [88].

As infecções por micobactérias não tuberculosas ocorrem pela inalação de aerossóis ou por inoculação, não havendo evidência de transmissão pessoa-a-pessoa, mesmo em casos de infecções em doentes imunocomprometidos, como por exemplo por VIH/SIDA. As manifestações clínicas mais frequentes são as infecções respiratórias, ainda que infecções linfáticas, cutâneas e disseminadas também sejam relevantes [48, 132, 133]. Certas condições predisponentes tais como imunodeficiência de células T ou de macrófagos tendem a facilitar infecções por estas micobactérias. Do mesmo modo, lesões associadas à introdução de um material estranho, instrumentos não esterilizados ou cirurgias associadas a tratamentos estéticos, podem promover o desenvolvimento de infecções por estas micobactérias, principalmente por *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M.*

fortuitum [29]. No entanto, o desenvolvimento de infecção e doença depende das características de cada espécie e da presença de fatores de predisposição do hospedeiro [2, 48]. Não obstante, as espécies do complexo *M. avium* são responsáveis por grande parte destas infecções, incluindo linfadenites em crianças, infecções respiratórias, intestinais e disseminadas em doentes VIH-positivo ou outras condições de imunossupressão [96, 133].

As infecções por micobactérias não tuberculosas não são de notificação obrigatória, pelo que os dados relativos à ocorrência das mesmas são limitados. No entanto, vários estudos apontam para um aumento destas infecções nas últimas décadas [2, 22, 48, 144].

1.3 Antibióticos utilizados no combate à tuberculose e outras micobacterioses

O esquema terapêutico usado no combate à tuberculose evoluiu ao longo dos anos com a sucessiva introdução de novos antibióticos que permitiram um aumento da sua eficácia, associada a uma redução do tempo necessário ao regime terapêutico. Na década de 1940, o regime terapêutico baseava-se na monoterapia com estreptomicina ou ácido paraminossalicílico. Porém, o aparecimento de estirpes resistentes levou ao uso combinado dos dois agentes. Em 1952, a isoniazida foi introduzida no tratamento da tuberculose em combinação com a estreptomicina e o ácido paraminossalicílico e em 1960, seguiu-se o etambutol em substituição do ácido paraminossalicílico. Na década de 1970, a rifampicina é adicionada ao esquema terapêutico e finalmente em 1980, é introduzida a pirazinamida [31].

Atualmente, o tratamento de tuberculose consiste num esquema terapêutico com a duração de seis meses dividido em duas fases. A primeira fase, com a duração de dois meses, compreende a toma combinada de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, designados por agentes de primeira linha, sendo a isoniazida e a rifampicina os mais eficazes. A segunda fase, com uma duração de quatro meses, consiste na toma combinada de isoniazida e rifampicina [87].

No tratamento da tuberculose causada por estirpes resistentes a um ou mais agentes de primeira linha, recorre-se a outros antibióticos, denominados de agentes de segunda linha, que apresentam menor eficácia e maior toxicidade [39, 84]. Estes agentes incluem

as fluoroquinolonas ofloxacina, moxifloxacina e levofloxacina, os aminoglicosídeos injetáveis estreptomicina, amicacina e canamicina, o polipeptídeo etionamida e o ácido paraminossalicílico, entre outros. Nestes casos, o regime terapêutico é prolongado podendo estender-se até aos 24 meses [87].

Ao contrário da tuberculose, que possui um regime de tratamento pré-estabelecido, o tratamento das infeções por micobactérias não tuberculosas não possui um regime definido e varia consoante o agente e o local da infeção [48, 84]. As infeções causadas por espécies do complexo *M. avium* são geralmente tratadas com os macrólidos claritromicina e azitromicina em combinação com a rifampicina ou rifabutina e etambutol. Este esquema terapêutico pode ser também usado no tratamento de infeções causadas por outras micobactérias não tuberculosas, embora não seja eficaz para todas as micobacterioses [48, 84].

1.4 Mecanismos de resistência aos antibióticos

As micobactérias possuem resistência intrínseca a várias classes de antibióticos, tal como os glicopéptidos, devido em grande parte, à existência de ácidos micólicos na parede celular que lhes conferem uma permeabilidade reduzida a estes agentes [54, 82].

A aquisição de resistência aos antibióticos em bactérias pode ser devida à modificação do alvo, inativação/modificação enzimática do antibiótico, permeabilidade reduzida e efluxo, entre outros [16]. Classicamente, a resistência adquirida em micobactérias, particularmente *M. tuberculosis*, é atribuída à ocorrência de mutações em genes cromossomais (Tabela 1), contrariamente a outras espécies bacterianas em que está normalmente associada à aquisição de material genético exógeno, como plasmídeos ou transposões [31].

Tabela 1. Mecanismos de ação dos principais antibióticos utilizados no tratamento de tuberculose e outras micobacterioses e principais mecanismos de resistência mutacionais aos mesmos [20, 21, 75].

Classe / Antibiótico	Alvo	Mecanismo de ação	Principais mutações associadas à resistência
Isoniazida (necessária enzima KatG para conversão em forma ativa)	Enoyl-ACP (“acyl carrier potein”) redutase (InhA)	Inibição da biossíntese de ácidos micólicos	Mutações nos genes <i>katG</i> e <i>inhA</i>
Rifampicina	RNA polimerase, subunidade β	Inibição da transcrição	Mutações no gene <i>rpoB</i>
Pirazinamida (necessária enzima PncA para conversão em forma ativa)	Proteína S1 da subunidade ribossomal 30S	Inibição da tradução e acidificação do citoplasma	Mutações no gene <i>pncA</i>
Etambutol	Arabinosil transferase	Inibição da biossíntese do arabinoglicano e lipoarabinomanana	Mutações no operão <i>embCAB</i>
Estreptomicina	Proteína S12 e 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S	Inibição da síntese proteica	Mutações nos genes <i>rpsL</i> e <i>rrs</i>
Ácido paraminossalicílico	Dihidropteroato sintase	Inibição da síntese de folatos	Mutações no gene <i>thyA</i>
Etionamida	Enoyl-ACP (“acyl carrier potein”) redutase (InhA)	Inibição da biossíntese de ácidos micólicos	Mutações no gene <i>inhA</i>
Fluoroquinolonas	DNA girase (GyrA/B)	Inibição da replicação do DNA	Mutações nos genes <i>gyrA/B</i>
Capreomicina	Subunidades ribossomais 30S e 50S	Inibição da síntese proteica	Mutações nos genes <i>rrs</i> and <i>tlyA</i>
Aminoglicosídeos	Subunidade ribossomal 30S	Inibição da síntese proteica	Mutações no gene <i>rrs</i>
Cicloserina	D-alanina ligase	Inibição da síntese de peptidoglicano	Mutações no gene <i>alrA</i>
Macrólidos	Proteína 23S da subunidade ribossomal 50S	Inibição da síntese proteica	Mutações nos genes <i>rrl</i> e <i>emr</i>

Apesar da resistência adquirida em micobactérias ser sobretudo atribuída à aquisição de mutações, vários estudos recentes têm demonstrado o papel dos sistemas de efluxo na resistência aos antibióticos. Estes sistemas efetuam o transporte ativo do antibiótico através da membrana celular para o exterior da célula, diminuindo a sua concentração intracelular [76, 108, 112, 113].

1.5 Sistemas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas de membrana capazes de exportar diversos compostos do ambiente intracelular para o exterior da célula, desempenhando assim um papel essencial no metabolismo celular [127]. As bombas de efluxo diferem entre si na sua topologia de membrana, fonte de energia e especificidade de substratos [94]. Relativamente aos substratos, as bombas de efluxo podem ser específicas, fazendo o transporte de um composto ou uma classe de compostos, ou podem estar associadas a multirresistência, pelo transporte de diversos compostos estrutural e quimicamente distintos. Até ao momento, foram descritas cinco famílias de bombas de efluxo associadas a multirresistência (Figura 2): a superfamília “ATP-binding cassette” (ABC), a superfamília “major facilitator” (MFS), a família “resistance-nodulation-cell division” (RND), a família “small multidrug resistance” (SMR) e a família “multidrug and toxic compound extrusion” (MATE) [94, 127].

Os sistemas de efluxo podem ser classificados como primários ou secundários, mediante a fonte de energia utilizada para efetuar o transporte ativo dos substratos. Os sistemas de efluxo primários utilizam a energia gerada pela hidrólise do ATP (do inglês “adenosine triphosphate”) e integram-se neste grupo as bombas de efluxo pertencentes à superfamília ABC. Por sua vez, os sistemas de efluxo secundários utilizam como fonte de energia o gradiente eletroquímico protónico gerado na membrana citoplasmática, estando incluídas neste grupo as restantes famílias; MFS, RND, SMR e MATE [94, 95, 127]. Alguns sistemas de efluxo da família MATE podem utilizar o gradiente membranar de iões sódio como fonte de energia para o transporte ativo dos seus substratos [86].

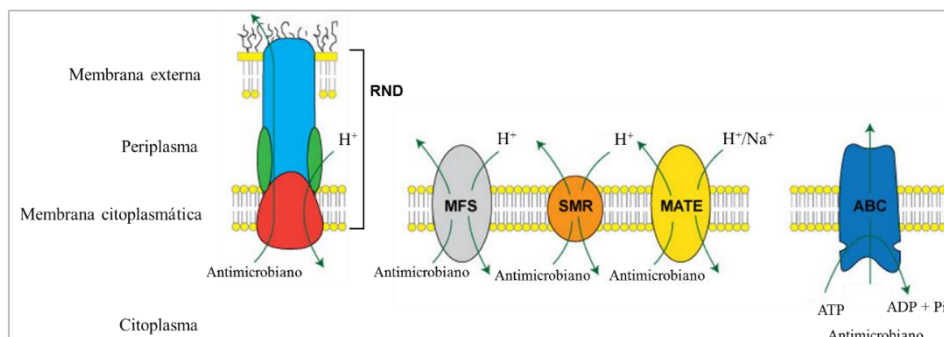


Figura 2. Representação esquemática das cinco famílias de bombas de efluxo associadas a multirresistência em bactérias. ABC: “ATP-binding cassette”; MFS: “major facilitator superfamily”; RND: “resistance-nodulation-cell division”; SMR: “small multidrug resistance”; MATE: “multidrug and toxic compound extrusion”. Adaptado de [130].

1.5.1 Superfamília “ATP-binding cassette” (ABC)

As bombas de efluxo ABC possuem diversos substratos, incluindo açúcares, aminoácidos e/ou agentes antimicrobianos [37, 91]. Estas proteínas possuem dois domínios transmembranares que formam uma via pela qual o substrato atravessa a membrana e dois domínios citoplasmáticos de ligação a nucleótidos responsáveis pela ligação ao ATP e a sua hidrólise [38, 73, 85].

Várias bombas ABC têm sido descritas em bactérias, incluindo a LmrA, presente em *Lactococcus lactis*, responsável pela extrusão de compostos catiónicos. Esta bomba de efluxo é estruturalmente semelhante à glicoproteína P (P-gp) presente em células humanas [135, 148]. Outros exemplos de bombas de efluxo ABC bacterianas são: a EfrAB, presente em *Enterococcus faecalis*, a VcaM de *Vibrio cholerae* e DrrAB de *M. tuberculosis*. Estas bombas de efluxo conferem resistência a diversos agentes antimicrobianos, incluindo a tetraciclina e fluoroquinolonas [23, 66, 104].

1.5.2 Superfamília “major facilitator” (MFS)

A superfamília MFS consiste num dos maiores grupos de bombas de efluxo encontradas em bactérias, capazes de transportar compostos diversos, incluindo açúcares, oligossacáridos, inositol, agentes antimicrobianos, aminoácidos, nucleótidos, agentes antissépticos e desinfetantes e uma grande variedade de aniões e catiões inorgânicos [117, 145].

Os sistemas de efluxo MFS podem apresentar doze segmentos transmembranares, como a NorA de *Staphylococcus aureus*, ou catorze segmentos transmembranares, como a QacA e a LfrA identificadas em *S. aureus* e *M. smegmatis*, respetivamente [104, 128]. Outros sistemas de efluxo MFS têm sido também identificados em bactérias Gram-negativas, tais como EmrB e MdfA em *Escherichia coli*, que conferem resistência a diferentes agentes antimicrobianos, incluindo fluoroquinolonas e cloranfenicol [104].

1.5.3 Família “resistance-nodulation-cell division” (RND)

Os sistemas de efluxo RND apresentam um largo espectro de substratos incluindo várias classes de agentes antimicrobianos, agentes antissépticos, corantes, e detergentes [94]. Estes sistemas são tripartidos, encontrando-se maioritariamente em bactérias Gram-negativas. Os sistemas RND são constituídos por três componentes estruturais que atravessam tanto a membrana citoplasmática como a membrana externa, sendo estes um transportador de membrana citoplasmática (bomba de efluxo) de doze segmentos transmembranares; um canal de membrana externa, e uma proteína de fusão de membrana que liga os componentes anteriores. Esta organização estrutural permite a extrusão de substratos a partir do compartimento citoplasmático e/ou do periplasma para o meio extracelular [94].

O sistema RND AcrAB/TolC de *E. coli* é um dos sistemas de efluxo mais estudados, consistindo na proteína de fusão AcrA, na bomba de efluxo AcrB e no canal de membrana externa TolC [147]. Outras bombas de efluxo RND já identificadas incluem MexB de *Pseudomonas aeruginosa*, CmeB de *Campylobacter jejuni* e MtrD de *Neisseria gonorrhoeae* [104].

1.5.4 Família “small multidrug resistance” (SMR)

A família SMR consiste em bombas de efluxo que possuem apenas quatro segmentos transmembranares. Estas bombas podem funcionar como complexos homo ou hetero-oligoméricos e estão envolvidas no efluxo de compostos catiónicos, tais como agentes antissépticos, desinfetantes e corantes [10].

Entre os membros desta família contam-se a EmrE presente em *E. coli*, Mmr de *M. tuberculosis* e Smr de *S. aureus* [34, 104].

1.5.5 Família “multidrug and toxic compound extrusion family” (MATE)

A família MATE foi identificada recentemente, pelo que é menos conhecida [86]. As bombas de efluxo MATE são constituídas por doze segmentos transmembranares e estão envolvidas na extrusão de várias classes de agentes antimicrobianos, antissépticos,

desinfetantes e corantes [63, 86]. As bombas de efluxo desta família utilizam o gradiente eletroquímico protónico como fonte de energia, no entanto, algumas podem utilizar em alternativa o gradiente iónico de sódio (Na^+) gerado na membrana citoplasmática [63, 86].

Várias bombas de efluxo MATE têm sido caracterizadas, incluindo MepA em *S. aureus*, NorM em *V. parahaemolyticus*, VcrM e VcmA em *V. cholerae* e PmpM em *P. aeruginosa* [104].

1.6 Bombas de efluxo em micobactérias

A associação entre bombas de efluxo e resistência aos antibióticos em micobactérias tem sido demonstrada por vários estudos ao longo dos últimos anos [43, 76, 91]. A primeira evidência surgiu com a rápida emergência de estirpes resistentes às fluoroquinolonas, quando estas foram introduzidas no tratamento da tuberculose pulmonar multirresistente [71, 103, 128]. Desde então, a atividade de efluxo tem sido associada à resistência a diversos antibióticos, como a isoniazida, a rifampicina e o etambutol [1, 38, 75]. A Tabela 2 sumariza as bombas de efluxo já identificadas em micobactérias e associadas à resistência a agentes antimicrobianos.

A análise do genoma de *M. tuberculosis* permitiu identificar vários genes que codificam possíveis bombas de efluxo. Por exemplo, aproximadamente 2,5% do seu genoma corresponde a genes que codificam bombas de efluxo pertencentes à superfamília ABC [17, 23, 32]. No entanto, somente alguns foram caracterizados, como a bomba de efluxo DrrAB, para a qual foi demonstrado que a sobreexpressão do gene que a codifica, *drrAB*, em *M. smegmatis* confere resistência a uma vasta gama de antibióticos, incluindo o etambutol e a estreptomicina [23].

Foram igualmente identificados vários genes que codificam possíveis bombas de efluxo pertencentes à família RND designadas MmpL (do inglês, “mycobacterial membrane protein large”), que poderão estar envolvidas no transporte de lípidos [37, 131]. Entre estas, foi demonstrado que a MmpL7 confere altos níveis de resistência à isoniazida em *M. smegmatis* [92].

Várias bombas de efluxo MFS têm também sido identificadas e caracterizadas em micobactérias, tendo sido a bomba de efluxo EfpA a primeira a ser descrita em *M.*

tuberculosis. Estudos demonstraram que o gene que a codifica, *efpA*, é sobreexpresso na presença de isoniazida, sugerindo a seu envolvimento na resistência a este agente antimicrobiano em *M. tuberculosis* [67, 68, 76, 112]. A caracterização da bomba de efluxo Tap em *M. fortuitum* levou à identificação do seu homólogo Rv1258c em *M. tuberculosis*. Foi demonstrado que a clonagem e sobreexpressão em *M. smegmatis* do gene que a codifica, *tap*, promove baixos níveis de resistência à tetraciclina e aminoglicosídeos [1]. Por sua vez, a bomba de efluxo P55, descrita em *M. bovis* e *M. tuberculosis*, confere resistência a aminoglicosídeos, isoniazida, tetraciclina e rifampicina [108, 124].

Outros possíveis sistemas de efluxo têm sido identificados em micobactérias, como Rv0341-Rv0342-Rv0343 presente em *M. tuberculosis*. Este sistema é codificado por um operão composto por três genes designados por *iniB*, *iniA* e *iniC*, sendo a sua expressão induzida pela isoniazida. Entre estes genes, *iniA* é o mais estudado, tendo sido evidenciado que quando expresso em *M. bovis* confere resistência à isoniazida e ao etambutol, antibióticos de primeira linha. Para além disso, foi demonstrado que a deleção de *iniA* resulta num aumento da suscetibilidade à isoniazida [26].

Tabela 2. Bombas de efluxo identificadas e caracterizadas em micobactérias.

Bomba de efluxo	Espécie (s) micobacteriana (s)	Família	Substrato (s)	Referências
LfrA	<i>M. smegmatis</i>	MFS	fluoroquinolonas; EtBr, ACR, EMB, RIF	[69, 71, 111]
EfpA	<i>M. tuberculosis</i>	MFS	INH	[38]
Tap	<i>M. fortuitum</i>	MFS	aminoglicosídeos; TET	[1]
Rv1258c	<i>M. tuberculosis</i>	MFS	aminoglicosídeos; TET; INH; RIF; EMB; OFX	[1, 75]
Rv1410c (P55)	<i>M. bovis</i> BCG, <i>M. tuberculosis</i>	MFS	aminoglicosídeos; TET; INH; RIF	[75, 108, 124]
Tet(V)	<i>M. smegmatis</i> ; <i>M. fortuitum</i>	MFS	TET	[35]
Rv2136c	<i>M. tuberculosis</i>	MFS	INH; RIF	[57, 75]
Rv1634	<i>M. tuberculosis</i>	MFS	Nd	[36, 75]
Rv1877	<i>M. tuberculosis</i>	MFS	TET; KAN; ERY	[36, 75]
Rv2994	<i>M. tuberculosis</i>	MFS	Nd	[36, 75]
Rv3239c	<i>M. tuberculosis</i>	MFS	açúcares; agentes antimicrobianos	[36, 75]
Rv2459c	<i>M. tuberculosis</i>	MFS	agentes antimicrobianos	[36, 75]
Rv3728	<i>M. tuberculosis</i>	MFS	açúcares; agentes antimicrobianos	[36, 75]
Rv2333c	<i>M. tuberculosis</i> ; <i>M. bovis</i>	MFS	TET; SPT	[107]
Pst	<i>M. tuberculosis</i> ; <i>M. smegmatis</i>	ABC	fluoroquinolonas; INH	[13]
Rv2686c- Rv2687c- Rv2688c	<i>M. tuberculosis</i>	ABC	fluoroquinolonas	[91]
DrrAB	<i>M. tuberculosis</i>	ABC	TET; ERY; EMB; NOR; CHL	[23]
Rv1348	<i>M. tuberculosis</i>	ABC	agentes antimicrobianos	[27, 75]

ABC: “ATP- binding cassette”; MFS: “Major facilitator superfamily”; SMR: “small multidrug resistance”; RND: resistance-nodulation-cell division”; ACR: acriflavina; CHL: cloranfenicol; EMB: etambutol; ERY: eritromicina; EtBr: brometo de etídio; KAN: canamicina; SPT: espectinomicina; INH: isoniazida; TET: tetraciclina; RIF: rifampicina; NOR: norfloxacin; nd: não determinado.

Tabela 2. (continuação)

Bomba de efluxo	Espécie (s) micobacteriana (s)	Família	Substrato (s)	Referências
Rv1819c	<i>M. tuberculosis</i>	ABC	INH; RIF	[57, 75]
Rv1747	<i>M. tuberculosis</i>	ABC	nd	[17]
Rv1456c	<i>M. tuberculosis</i>	ABC	nd	[27, 75]
Rv0194	<i>M. tuberculosis</i>	ABC	β -lactâmicos; ERY	[33]
Rv1218	<i>M. tuberculosis</i>	ABC	novobiocina; pirazolonas; biarilpiperazinas; bisanilinopirimidinas; pirroles; piridonas	[8]
Rv3679	<i>M. tuberculosis</i>	ATPase	nd	[27, 75]
Mmr	<i>M. tuberculosis</i>	SMR	EtBr; ERY; TPP; INH; ACR	[34, 76]
MmpL7	<i>M. tuberculosis</i> ; <i>M. smegmatis</i>	RND	INH	[92]
MmpL5	<i>M. tuberculosis</i>	RND	azóis	[80]
Mmp	<i>M. smegmatis</i>	MATE	KAN; PM; BLM; CP; AMK; CPC	[81]
IniA- IniB- IniC	<i>M. tuberculosis</i>	nd	EMB; INH	[26]
Rv3806c	<i>M. tuberculosis</i>	Proteína de membrana	nd	[27, 75]
Rv1002c	<i>M. tuberculosis</i>	Proteína de membrana	nd	[27, 75]

MATE: “Multidrug and toxic compound extrusion”; SMR: “small multidrug resistance”; RND: resistance-nodulation-cell division”; AMK: amicacina; BLM: bleomicina; CP: capreomicina; ACR: acriflavina; CPC: Cloreto de cetilpiridínio; EMB: etambutol; KAN: canamicina; INH: isoniazida; PM: fleomicina; nd: não determinado.

1.7 Sistema de efluxo LfrA de *Mycobacterium smegmatis*

A LfrA foi a primeira bomba de efluxo descrita em micobactérias, precisamente em *M. smegmatis*, por Takiff *et al.* e consiste num sistema de efluxo MFS com 504 aminoácidos distribuídos em 14 segmentos transmembranares [128]. Esta bomba apresenta homologia com outros sistemas de efluxo MFS, tal como QacA de *S. aureus* (35% de identidade), tendo sido associada à resistência a compostos catiónicos, incluindo o corante brometo de etídeo (EtBr) [128]. Foi demonstrado que a sobreexpressão do gene

que a codifica, *lfrA*, promove resistência ao EtBr, acriflavina e fluoroquinolonas [71], e que a sua deleção ou inativação promove um aumento da suscetibilidade a estes compostos [69, 119]. Um estudo posterior localizou o gene *lfrA* no operão *lfrRA*, juntamente com o gene *lfrR* que codifica o repressor transcricional LfrR, pertencente à família TetR. Os dois genes são cotranscritos por um promotor comum, sendo a transcrição do operão *lfrRA* reprimida através da ligação de LfrR à região promotora de *lfrRA* [19]. A deleção de *lfrR* origina um aumento da expressão de *lfrA*, culminando num aumento de resistência às fluoroquinolonas e ao EtBr [19]. Posteriormente, foi demonstrado que os substratos da bomba de efluxo LfrA regulam positivamente a sua expressão ao promover a dissociação do complexo repressor-operador [12].

1.8 Inibidores de efluxo (IEs)

Nos últimos anos, com a emergência de resistência a todas as classes de antibióticos, a busca de novos compostos, ou mesmo fármacos já utilizados na clínica capazes de diminuir a atividade de sistemas de efluxo tem sido o foco de vários estudos [6, 89, 120, 137, 141, 149], os quais identificaram compostos cuja atividade inibitória de efluxo permite restaurar a ação de antibióticos para os quais uma determinada bactéria se tornou resistente. Nesta perspectiva, o uso combinado de um antibiótico e de um composto com atividade inibitória de efluxo seria uma forma de melhorar a eficácia do agente ou mesmo restaurar a suscetibilidade inicial bacteriana, prevenindo assim a emergência de estirpes resistentes [120, 141].

São vários os inibidores de efluxo identificados até à data, incluindo as fenotiazinas e o verapamil, utilizados neste trabalho e descritos em maior pormenor nos pontos que se seguem.

1.8.1 Fenotiazinas

As fenotiazinas são agentes antipsicóticos e antieméticos que atuam como antagonistas dos recetores da dopamina e inibidores da calmodulina [3, 60, 120]. A clorpromazina (CPZ) foi o primeiro agente antipsicótico desta classe, produzido comercialmente a partir de 1953. Contudo, devido à graves efeitos secundários, foi

posteriormente substituído por um derivado com menor toxicidade, a tioridazina (TZ). Sendo moléculas amplamente utilizadas, as suas propriedades antimicrobianas foram logo evidenciadas em diversas espécies bacterianas, incluindo *M. tuberculosis* [3, 4, 61]. Embora o mecanismo de ação destas moléculas não esteja ainda clarificado, sabe-se que inibem o transporte de potássio do ambiente extracelular para o interior da célula. Para além disso, inibem o transporte de cálcio originando a sua depleção no meio intracelular e, conseqüentemente, a inibição de enzimas dependentes de cálcio, tais como as ATPases que hidrolisam o ATP e assim libertam energia que é utilizada pelos sistemas de efluxo [4, 5, 89]. Deste modo, estes compostos inibem indiretamente os sistemas de efluxo que possuem uma dependência energética destas ATPases [3, 5]. Outros estudos têm mostrado que a tioridazina é um inibidor da enzima NADH-menaquinona desidrogenase do tipo II (NDH-2), uma enzima essencial na cadeia respiratória celular de *M. tuberculosis* [109, 143].

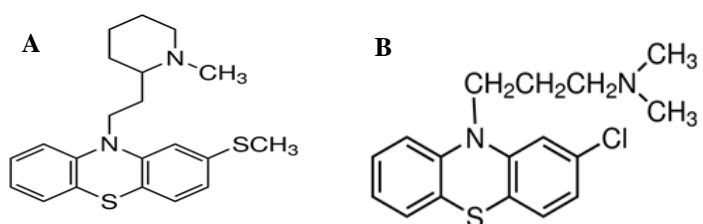


Figura 3. Estrutura química da clorpromazina (A) e da tioridazina (B).

1.8.2 Verapamil (VP)

O verapamil (VP) é um protótipo da classe das fenilalquilaminas, bloqueadores de canais de cálcio (Ca^{2+}), clinicamente utilizados no tratamento de várias doenças cardiovasculares, como a hipertensão, angina e arritmia cardíaca. Pensa-se que o bloqueio do fluxo dos iões Ca^{2+} ocorre pela ligação destes compostos a um local específico na extremidade citoplasmática destes canais [7].

Vários estudos têm apontado o papel do verapamil como potencial inibidor de efluxo em várias espécies bacterianas e como potenciador da atividade de antibióticos, nomeadamente a isoniazida em *M. tuberculosis* [52, 76].

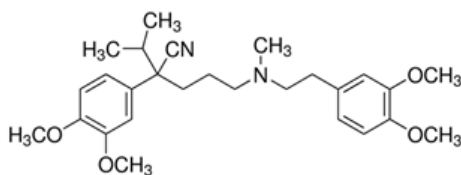


Figura 4. Estrutura química do verapamil.

1.9 Avaliação da atividade de efluxo por fluorometria

Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade de efluxo em diversas espécies bacterianas, incluindo micobactérias [139]. Entre estes, o método fluorométrico desenvolvido por Viveiros *et al.* permite uma rápida detecção da atividade de efluxo, utilizando o EtBr como marcador, uma vez que este é um substrato comum de bombas de efluxo. O EtBr é um fluorocromo que emite fraca fluorescência em ambiente aquoso (extracelular) e maior fluorescência quando se acumula no periplasma ou citoplasma [90, 140]. Este método permite assim o estudo da cinética do transporte do EtBr, possibilitando a avaliação da acumulação/efluxo do mesmo em tempo-real, monitorizado num aparelho Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Research) [90].

Os ensaios de acumulação de EtBr são uma avaliação indireta da capacidade de efluxo de EtBr de uma determinada estirpe. Neste ensaio, a acumulação de EtBr no interior da célula bacteriana é medida ao longo do tempo na ausência e na presença de um composto com atividade inibitória de efluxo. O diferencial do valor de fluorescência final de cada condição é indicativo da capacidade de inibição de efluxo do composto para uma dada estirpe bacteriana [140]. Como exemplo, a Figura 5 representa um ensaio de acumulação de EtBr para a estirpe selvagem *M. smegmatis* mc²155.

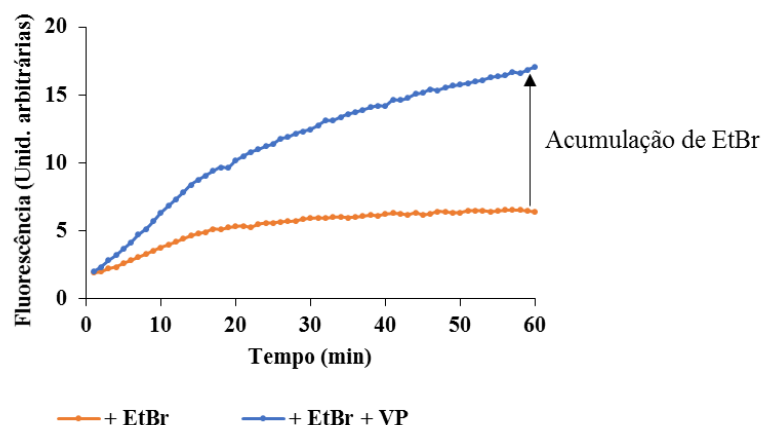


Figura 5. Ensaio de acumulação de EtBr para a estirpe *M. smegmatis* mc²155, na ausência e presença do inibidor de efluxo verapamil (VP).

A atividade de efluxo pode também ser avaliada diretamente, recorrendo a ensaios de efluxo. Nestes, é efetuado um primeiro passo que permite uma acumulação intracelular máxima de EtBr (temperatura ambiente, presença de inibidor de efluxo e ausência de fonte de energia) [140]. Após este passo, as condições de efluxo são restauradas através da adição de uma fonte de energia (glucose), e a perda de fluorescência associada à extrusão de EtBr é medida ao longo do tempo. Como exemplo, a Figura 6 representa um ensaio de efluxo de EtBr para a estirpe selvagem *M. smegmatis* mc²155, em que é observada uma diminuição gradual de fluorescência na presença de glucose.

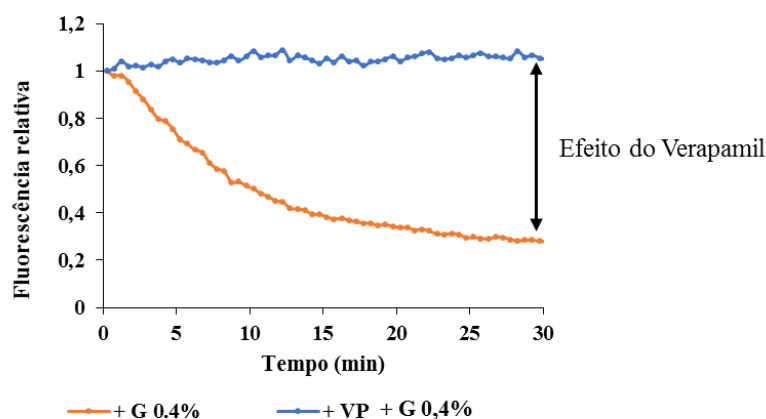


Figura 6. Ensaio de efluxo do EtBr para a estirpe *M. smegmatis* mc²155, na presença de glucose 0,4 % (curva laranja) e glucose com inibidor de efluxo verapamil (VP) (curva azul).

1.10 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal a construção e otimização de um modelo experimental para rastreio e identificação de novos compostos com potencial terapêutico para a tuberculose e outras micobacterioses. Este modelo foi desenvolvido e otimizado recorrendo a duas estirpes de *M. smegmatis*, uma micobactéria de crescimento rápido; a estirpe selvagem mc²155 e a estirpe mutante XZL1675, com o gene da bomba de efluxo LfrA parcialmente deletado. Experimentalmente, este modelo consiste em várias etapas, nas quais se determina: (i) a concentração mínima inibitória (CMI) do composto em avaliação; (ii) a capacidade desse composto para reduzir CMIs de antibióticos e EtBr; (iii) e (iv) o efeito do composto na acumulação/efluxo de EtBr e (v) a interação entre antibióticos e o composto pelo método de “Checkerboard”. Após otimizado, este modelo será aplicado para avaliar novas moléculas, utilizando apenas a estirpe selvagem, mc²155. Pretende-se assim desenvolver uma estratégia metodológica que permita identificar de uma forma rápida e eficaz compostos com potencial atividade antimicobacteriana ou adjuvante dos antibióticos já em uso, por inibição de efluxo ou outro mecanismo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Estirpes bacterianas

Para este estudo foram utilizadas duas estirpes isogênicas de *M. smegmatis*, a estirpe selvagem *M. smegmatis* mc²155 e a estirpe mutante *M. smegmatis* XZL1675, que corresponde à estirpe mc²155 com o gene *lfrA* parcialmente deletado (Tabela 3). O gene *lfrA* codifica para a bomba de efluxo LfrA, que confere baixa resistência às fluoroquinolonas, etambutol, rifampicina e ao EtBr [69, 111]. A estirpe *M. smegmatis* mc²155, derivada da estirpe de referência ATCC[®] 607TM [126], é amplamente utilizada como modelo genético de investigação de outras micobactérias de importância clínica.

Tabela 3. Estirpes de *M. smegmatis* utilizadas neste trabalho.

Estirpe	Descrição	Referências
mc ² 155	Estirpe selvagem	Coleção do laboratório de Micobactérias do IHMT/UNL
XZL1675	mc ² 155 Δ <i>lfrA</i>	[69]

2.1.2 Outro material biológico

O marcador GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo scientific, Waltham, E.U.A.) foi utilizado como referência na análise de produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose. Os “primers” utilizados para a análise por PCR da sequência nucleotídica do gene *lfrA*, bem como para a análise por RT-qPCR (do inglês, “reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction”) da expressão de genes codificantes para bombas de efluxo encontram-se descritos na Tabela 4. Estes “primers” foram desenhados usando o programa Primer 3 (v. 0.4.0) [62, 134] e testados no programa Primer-Blast [146].

Tabela 4. Sequências nucleotídica dos “primers” utilizados neste trabalho.

“Primers”	Sequência nucleotídica (5’ – 3’)	Amplicação (pb)	Referência
<i>Para PCR:</i>			
LfrA_Fw	GTTATGAGGCAGCCAAGGAC	1230	Este trabalho
LfrA_Rv	GGTCGGGTTCCTGATGATCC		
<i>Para RT-qPCR:</i>			
lfrA_Fw	TCATCTCGCAGCACCTTCAG	186	Este trabalho
lfrA_Rv	GGATCATCAGGAACCCGACC		
lfrR_Fw	GACCGAGAGGCCCGAATATC	73	Este trabalho
lfrR_Rv	CTCATAACCGGCCTGCATCA		
P55_Fw	ATCACCAGCATCGTCAGGT	176	Este trabalho
P55_Rv	CAGCAGGTCACACCCATCAT		
efpA_Fw	GGTGTCTGGATTTCATCCCGTT	139	Este trabalho
efpA_Rv	TCGAACCGTAGATCATGGCG		
tap_Fw	AGGGACTGCAATTCGTCTGG	120	Este trabalho
tap_Rv	GGTCGGTGAAGTACTTGGGG		
16S_Fw	CAAGGCTAAAACTCAAAGGA	197	Este trabalho
16S_Rv	GGACTTAACCCAACATCTCA		

pb: pares de bases

2.1.3 Meios de cultura

A composição dos meios de cultura utilizados para o crescimento das estirpes de *M. smegmatis* encontra-se descrita na Tabela 5. O meio de cultura 7H9 foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, com adição do suplemento OADC a uma concentração final de 10 % (v/v). O meio de cultura Lowenstein-Jensen foi adquirido comercialmente.

Tabela 5. Composição dos meios de cultura e suplemento utilizados neste trabalho.

Meio/Suplemento ^(1, a)	Composição (L)
Middlebrook 7H9 Broth (7H9)	0,5 g de sulfato de amônio; 2,5 g de fosfato disódico; 1,0 g de fosfato monossódico; 0,1 g de citrato de sódio; 0,05 g de sulfato de magnésio; 0,0005 g de cloreto de cálcio; 0,001 g de sulfato de zinco; 0,001 g de sulfato de cobre; 0,04 g de citrato de amônio férrico; 0,5 g de ácido L-glutâmico; 0,001 g de piridoxina; 0,0005 g de biotina; pH 6,6 ± 0,2 a 25 °C.
Lowenstein-Jensen	0,6 g de citrato de sódio; 3,6 g de L-asparagina; 0,24 g de sulfato de magnésio; 0,4g de verde malaquita; 12 mL de glicerol; 2,4 g de fosfato monopotássio; 30 g de fécula de batata; 1000 mL de ovos
Ácido Oleico/ Albumina/ Dextrose/ Catalase (OADC)	0,6 mL de ácido oleico; 50 g de albumina bovina (fração V); 20 g de dextrose; 0,03 g de catalase; pH 6,9 ± 0,2 a 25 °C.

⁽¹⁾Becton, Dickinson & Company (Sparks, E.U.A.); ^(a) Armazenados a 4° C.

2.1.4 Reagentes e soluções

A composição e modo de preparação dos antibióticos, EtBr e inibidores de efluxo utilizados neste trabalho encontra-se descrita na Tabela 6.

Tabela 6. Composição e preparação das soluções “stock” dos antibióticos, EtBr e inibidores de efluxo utilizados neste trabalho.

Soluções	Peso molecular (g/mol)	Concentração “stock”
<i>Antibióticos e EtBr</i>		
Ciprofloxacina (CIP)^(1,a)	--	10 mg/mL em 98% de água bidestilada estéril e 2% de HCl ⁽³⁾ 37%
Ofloxacina (OFX)^(3,a)	--	10 mg/mL em água bidestilada estéril/NaOH ⁽²⁾ 0,1M 1:1 (v/v)
Eritromicina (ERY)^(3,a)	--	10 mg/mL em DMSO ⁽⁴⁾
Claritromicina (CLR)^(3,a)	--	10 mg/mL em DMSO
Etambutol (EMB)^(3,a)	--	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Rifampicina (RIF)^(3,a)	--	10 mg/mL em DMSO
Estreptomicina (STR)^(3,a)	--	10 mg/mL em água bidestilada estéril

⁽¹⁾Fluka (Buchs, Suíça); ⁽²⁾Panreac Química S.A. (Barcelona, Espanha); ⁽³⁾Sigma Aldrich S.A. (St. Louis, MO, E.U.A.); ⁽⁴⁾Merck (Darmstadt, Alemanha); ^(a)Armazenamento a -20°C; DMSO: dimetilsulfóxido; NaOH: hidróxido de sódio; HCl: ácido clorídrico. Diluições feitas em água bidestilada estéril.

Tabela 6. (Continuação)

Soluções	Peso molecular (g/mol)	Concentração “stock”
<i>Antibióticos e EtBr</i>		
Rifampicina (RIF) ^(3,a)	--	10 mg/mL em DMSO
Estreptomicina (STR) ^(3,a)	--	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Isoniazida (INH) ^(3,a)	--	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Brometo de Etídio (EtBr) ^(3,b)	--	10 mg/mL em água bidestilada estéril
<i>Inibidores de efluxo</i> ^(3,a)		
Clorpromazina (CPZ)	355,3	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Tioridazina (TZ)	370,57	10 mg/mL em água bidestilada estéril
Verapamil (VP)	491,09	10 mg/mL em água bidestilada estéril

⁽¹⁾Fluka; ⁽²⁾Panreac Química S.A.; ⁽³⁾Sigma; ⁽⁴⁾Merck; ^(a)Armazenamento a -20°C; ^(b)Armazenamento a 4°C; Diluições feitas em água bidestilada estéril; DMSO: dimetilsulfóxido; NaOH: hidróxido de sódio; HCl: ácido clorídrico

A composição e modo de preparação das soluções dos novos compostos Q-15.252 (fenilimidazolo) [100], EA156 e EA160 (tiazóisoxazolos) utilizados neste trabalho encontra-se descrita na Tabela 7. Estas moléculas foram desenhadas e sintetizadas por um grupo colaborador da Università degli studi di Parma, Itália.

Tabela 7. Composição e preparação das soluções “stock” dos novos compostos.

Novos compostos ^(a)	Peso molecular (g/mol)	Solução “stock”
Q-15.252	410,72	10 mg/mL em DMSO
EA156	384,23	10 mg/mL em DMSO
EA160	489,42	10 mg/mL em DMSO

^(a)Armazenamento a -20°C; Diluições feitas em água bidestilada estéril

A composição e modo de preparação de outras soluções e reagentes utilizados neste trabalho encontram-se descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Composição e preparação de outras soluções utilizadas neste trabalho.

Soluções	Concentração “stock”
Glucose ^(1,c)	20 % (p/v) água bidestilada estéril
PBS ^(1,a)	0,01 M tampão fosfato; 0,0027 M KCl; 0,137 M NaCl; pH 7,4 Uma pastilha em 200 mL de água bidestilada estéril
Soro fisiológico ^(2,a)	NaCl 0,9 % (p/v) água bidestilada estéril
Tween 80 ^(1, b, c)	20 % (v/v) água bidestilada estéril
TE ^(a)	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0
TAE 50X ⁽¹⁾	2 M Tris-acetato; 0,05 M EDTA; pH 8.3 ± 0.2 (25 °C) 1X: 40 mM; 1 mM EDTA
Proteinase K ⁽¹⁾	20 mg/mL água bidestilada estéril
Lisozima ⁽¹⁾	100 mg/mL água bidestilada estéril

⁽¹⁾ Sigma; ⁽²⁾Merck; ^(a)Autoclavado a 121 °C por 15 minutos a 1 bar e armazenamento a temperatura ambiente. ^(b) Esterilizado por filtração com filtro de 0,22 µm (aquecido a ± 40 °C). ^(c)Armazenamento a 4 °C. PBS: tampão fosfato salino (do inglês, “phosphate buffered saline”); KCl: cloreto de potássio; NaCl: cloreto de sódio; EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético; Tween 80: monooleato de polioxietilenosorbitano.

2.2 Métodos

2.2.1 Crescimento e manutenção das estirpes bacterianas

As estirpes de *M. smegmatis* utilizadas neste trabalho foram mantidas à temperatura ambiente em meio Lowenstein-Jensen. Para obter culturas em meio líquido, prepararam-se suspensões celulares iniciais ajustadas à escala de 0,5 McFarland, transferindo uma pequena quantidade de massa micobacteriana para soro fisiológico contendo esferas de vidro estéreis (Carl Roth, Karlsruhe, Alemanha). Estas suspensões foram vigorosamente agitadas em vórtex, sendo preparadas de imediato diluições 1:100, igualmente em soro fisiológico. Uma alíquota de 0,1 mL desta diluição foi transferida para 10 mL de meio 7H9 suplementado com OADC 10% (v/v) e Tween 80 0,05% (v/v) (este último apenas para os ensaios de fluorometria). As culturas foram incubadas a 37°C com agitação a 180 rotações por minuto (rpm) numa incubadora MaxQ™ 4000 (Thermo Scientific) até uma densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,8, medida num espectrofotômetro Spectronic™ 20D+ (Thermo Scientific).

2.2.2 Análise da sequência nucleotídica do gene *lfrA*

A sequência nucleotídica do gene *lfrA* da estirpe *M. smegmatis* XZL1675 foi analisada com o intuito de se conhecer a extensão da deleção do gene nesta estirpe.

2.2.2.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico das duas estirpes em estudo foi extraído com o sistema “QIAamp DNA mini kit” (Qiagen, E.U.A.), seguindo as orientações do fabricante, a partir de uma alíquota de 1 mL de culturas com $DO_{600} \geq 0,8$.

Resumidamente, as células micobacterianas foram recolhidas por centrifugação a 13.000 rpm (Biofuge Pico Heraeus, DJB Labcare, Alemanha) por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento bacteriano foi lavado com 1 mL de tampão TE e ressuspendido em 0,2 mL de tampão TE. De seguida, procedeu-se à lise celular e desproteinização, através de uma incubação da suspensão celular a 95 °C em banho seco durante 20 minutos, seguida de adição de 2 mg/mL de proteinase K (Sigma) e 0,2 mL de tampão de lise AL, agitação vigorosa e incubação a 56 °C em banho-maria durante 10 minutos. À suspensão (contendo o DNA) foram adicionados 0,2 mL de etanol 96 %, esta mistura foi aplicada a uma coluna QIAamp e centrifugada a 8.000 rpm durante 1 minuto. De seguida, efetuaram-se dois passos de lavagem sucessivos, primeiro com adição de 0,5 mL de tampão de lavagem AW1, seguido de centrifugação a 8.000 rpm durante 1 minuto, e a segunda com adição de 0,5 mL de tampão de lavagem AW2 e centrifugação a 13.000 rpm durante 3 minutos. Por fim, o DNA foi eluído da coluna adicionando 0,2 mL de tampão de eluição AE, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto.

2.2.2.2 Análise do gene *lfrA*

Para analisar a extensão da deleção no gene *lfrA* da estirpe *M. smegmatis* XZL1675, foi desenhado um par de “primers” para amplificação por PCR de um fragmento de 1230 pb. As reações de PCR foram preparadas num volume final de 0,05 mL contendo 2 U de

Taq polimerase (Thermo scientific); tampão *Taq* 1X (Thermo scientific); 1,75 mM de $MgCl_2$ (Thermo scientific); 200 μM de dNTPs (NZYTech, Lisboa); 25 pmol de cada “primer” e 0,005 mL de DNA genômico, utilizando-se água bidestilada estéril para completar o volume.

As reações de PCR foram realizadas num termociclador UNO II Biometra (Biometra, Alemanha), usando o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 1 minuto, emparelhamento a 51 °C durante 1 minuto e extensão a 72 °C durante 1 minuto, seguido de um passo final de extensão a 72 °C durante 5 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1 % (p/v), contendo 0,25 mg/L de EtBr, em tampão TAE 1X, durante 1 hora e 10 minutos a 80 V. Os produtos de PCR foram visualizados num aparelho Gel DocTM XR System (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, E.U.A.) e analisados com a ajuda do marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo scientific) no programa QuantityOne (v 4.6.1) (Bio-Rad).

Para remoção de fragmentos inespecíficos, o volume total das reações de PCR foi aplicado num gel de agarose a 1 % e foi efetuada uma eletroforese nas condições anteriormente descritas. As bandas correspondentes aos fragmentos de DNA desejados foram excisadas do gel de agarose e o DNA purificado utilizando o sistema “NZYGelpure” (NZYTech), seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, a cada porção de agarose foi adicionado 0,3 mL de tampão de ligação por cada 100 mg de agarose. Esta foi derretida por incubação a 55 °C em banho seco durante 5 minutos, e de seguida aplicada a uma coluna NZYTech. Seguidamente, realizou-se uma centrifugação a 13.000 rpm (Biofuge Pico Heraeus) durante 1 minuto, com posterior adição de 0,6 mL de tampão de lavagem, seguido de centrifugação nas mesmas condições. O DNA foi eluído com adição de 0,05 ml de tampão de eluição, incubação à temperatura ambiente durante 1 minuto e posterior centrifugação de 1 minuto a 13.000 rpm. Os produtos de DNA purificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose nas condições previamente descritas e guardados a -20°C.

Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciação na STAB VIDA Lda., usando o “primer” LfrA_Fw. As sequências obtidas foram analisadas com os

programas SnapGene® Viewer 2.8.2 (GSL Biotech, disponível em <http://www.snapgene.com/>) e “Clustal Omega” [123].

2.2.3 Análise da expressão de genes codificantes para bombas de efluxo

A expressão dos genes codificantes para bombas de efluxo, nomeadamente *lfrA*, *p55*, *tap* e *efpA* e do gene repressor *lfrR* foi analisada com o intuito de avaliar a expressão destes genes na estirpe *M. smegmatis* XZL1675 em relação à estirpe de *M. smegmatis* mc²155.

2.2.3.1 Extração de RNA total

O RNA total das estirpes em estudo foi extraído com o sistema “RNeasy mini kit” (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de uma alíquota de 1 mL de uma cultura a DO₆₀₀ de 0,78 a 0,8. Resumidamente, as células micobacterianas foram recolhidas por centrifugação a 13.000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após remoção de 0,5 mL de sobrenadante, o sedimento bacteriano foi ressuspenso no restante volume e adicionou-se 1 mL de RNeasy Protect Bacteria reagent (Qiagen) seguido de incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, foi efetuada a lise celular, pela adição de 3 mg/mL de lisozima (Sigma) e tampão RLT suplementado com β-mercaptoetanol (Sigma) a 1 % (v/v). As amostras foram colocadas num banho de ultrassons durante 15 minutos e posteriormente centrifugadas a 13.000 rpm durante 2 minutos. De seguida, foi adicionado 0,2 mL de 96 % etanol ao sobrenadante e este aplicado a uma coluna RNeasy e centrifugado a 13.000 rpm durante 15 segundos. Seguiu-se um passo de lavagem com adição de 0,35 mL de tampão RW1 e nova centrifugação. O DNA contaminante foi digerido (em coluna) com 3 U de DNase I RNase-free (Qiagen) durante 2 horas e 15 minutos à temperatura ambiente. De seguida, foi efetuado um novo passo de lavagem com 0,35 mL de tampão RW1 seguido de centrifugação. Por fim, foi feita a adição de 0,5 mL de tampão RLT, uma nova centrifugação a 13.000 rpm durante 15 segundos, sendo o RNA total eluído em dois passos sucessivos de adição de 0,04 mL de água RNase-free e centrifugação a 13.000

rpm durante um minuto. As amostras de RNA total foram imediatamente guardadas a -20 °C.

2.2.3.2 Análise de expressão génica por RT-qPCR

Os níveis de expressão dos genes *lfrA*, *p55*, *tap*, *efpA* e *lfrR* nas duas estirpes de *M. smegmatis* foram quantificados por RT-qPCR num aparelho Rotor-Gene™ 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia), utilizando o sistema “QuantiTect SYBR Green RT-PCR” (Qiagen). O 16S rDNA foi utilizado como controlo interno, pois o seu nível de expressão não sofre variação significativa entre diferentes ensaios. Foram efetuadas três extrações independentes de RNA total, sendo cada ensaio de RT-qPCR feito em duplicado.

Foi usado o seguinte programa de amplificação: transcrição reversa, com a “Omniscrypt Reverse Transcriptase” e “Sensiscript Reverse Transcriptase” a 50 °C durante 30 minutos; passo de ativação da “HotStarTaq Polymerase” a 95 °C durante 15 minutos; amplificação do cDNA em 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, emparelhamento a 52 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 30 segundos; passo de extensão final a 72 °C durante 5 minutos. No final de cada ciclo de amplificação é feita a aquisição de sinal emitido pelo fluorocromo SYBR Green I (aquando da sua ligação ao DNA em cadeia dupla). Para análise dos produtos, foi adicionado ao programa de amplificação um passo de “melting” com incubação a 50 °C durante 15 segundos seguido de um gradiente crescente de temperatura, no qual a temperatura sofre um aumento de 1 °C, a cada 5 segundos até aos 99 °C. Este processo determina a especificidade da reação, onde é possível determinar o ponto correspondente à dissociação de dímeros de “primers” e da sequência-alvo de produto inespecíficos.

O nível de expressão génica foi calculado pelo método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [72]. Neste, o nível de expressão de cada gene foi normalizado com o gene controlo (16S rDNA). Somente após esta normalização, foi determinado o nível de expressão de cada gene na estirpe mutante XZL1675 relativamente à sua expressão na estirpe selvagem mc²155. A expressão relativa de cada gene em estudo foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct referência})}$$

Equação 1. Expressão matemática para determinação do nível de expressão gênica, segundo o método comparativo. Neste corresponde ao ciclo de PCR limiar, a amostra corresponde à estirpe *M. smegmatis* XZL1675 e a referência à estirpe *M. smegmatis* mc²155 [72].

2.2.4 Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMIs)

2.2.4.1 Preparação do inóculo

Foram preparadas culturas das duas estirpes em estudo de acordo com o descrito no ponto 2.2.1. Uma vez obtida uma DO₆₀₀ de 0,8, correspondente a meio da fase exponencial de crescimento, foi preparado um inóculo equivalente à escala de 0,5 McFarland em meio 7H9 suplementado com 10 % (v/v) de OADC.

2.2.4.2 Determinação de CMIs dos antibióticos e EtBr

A determinação de CMIs dos antibióticos em estudo e EtBr foi realizada conforme as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), em placas de 96 poços, pelo método de microdiluição em meio líquido [24] (Figura 7).

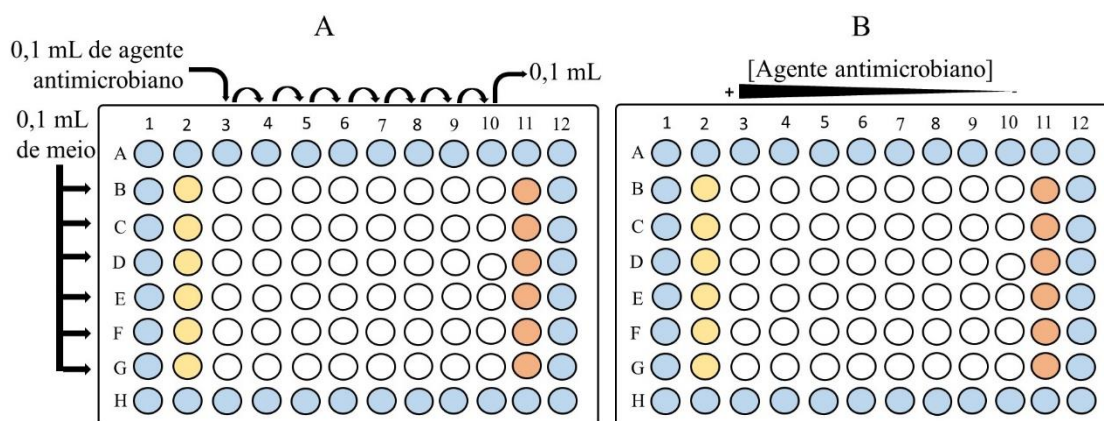


Figura 7. Representação esquemática do modo de preparação de placas de 96 poços para determinação de CMIs pelo método de microdiluição em meio líquido (A) e distribuição final da concentração de agente antimicrobiano na placa (B). Poços a azul: água bidestilada; poços a amarelo: controle de esterilidade (somente meio); poços a laranja: controle de crescimento (meio e inóculo).

As placas de 96 poços foram preparadas de acordo com a representação da Figura 7. Foram adicionadas aos poços exteriores alíquotas de 0,1 mL de água bidestilada estéril

para minimizar a evaporação do conteúdo da placa (poços a azul). Nos restantes poços da placa colocaram-se 0,1 mL de meio 7H9, e de seguida adicionou-se 0,1 mL de uma solução do agente antimicrobiano a ser testado a cada poço da coluna 3. De seguida, foram efetuadas diluições seriadas 1:2, transferindo 0,1 mL do conteúdo do poço da coluna 3 para o poço da coluna 4. Este passo foi repetido sucessivamente até ao poço da coluna 10, sendo rejeitado 0,1 mL da última diluição. Após a diluição seriada, foi adicionada uma alíquota de 0,1 mL de inóculo a todos os poços das colunas 3 a 11. Os poços da coluna 2, contendo apenas meio de cultura, foram utilizados como controlos de esterilidade (controlo negativo), enquanto os poços da coluna 11 foram utilizados como controlos de crescimento da estirpe em estudo (controlo positivo). A placa foi selada num saco de plástico (para minimizar evaporação do conteúdo) e incubada a 37 °C. A leitura foi efetuada visualmente após um período de incubação de 72 horas, sendo a CMI determinada como a menor concentração de agente antimicrobiano para a qual não se observou crescimento. As gamas de concentrações testadas para cada um dos antibióticos e EtBr encontram-se descritas na Tabela 9.

Tabela 9. Gama de concentrações testadas para os antibióticos e EtBr em estudo.

Antibióticos e EtBr	Gama de concentrações (mg/L)
CIP	0,031 - 4
OFX	0,031 - 4
ERY	4 - 512
CLR	0,5 - 64
EMB	0,031 - 4
RIF	0,5 - 64
STR	0,031 - 4
INH	0,5 - 64
EtBr	0,781 - 100 (para mc ² 155) 0,031 - 4 (para XZL1675)

CIP: ciprofloxacina; OFX: ofloxacina; ERY: eritromicina; CLR: claritromicina; EMB: etambutol; INH: isoniazida; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; INH: isoniazida; EtBr: brometo de etídio.

2.2.4.3 Determinação de CMI dos inibidores de efluxo (IEs) e dos novos compostos

A determinação das CMI dos inibidores de efluxo clorpromazina, tioridazina e verapamil, assim como dos novos compostos, foi realizada pelo método de microdiluição em meio líquido, conforme descrito no ponto anterior. As gamas de concentrações testadas encontram-se descritas na Tabela 10.

Tabela 10. Gama de concentrações testadas para os inibidores de efluxo e novos compostos em estudo.

IEs/ novos compostos	Gama de concentrações (mg/L)
<i>IEs</i>	
CPZ	0,938 – 120
TZ	0,938 – 120
VP	12,5 – 1600
<i>Novos compostos</i>	
Q-15.252	0,5 – 64
EA156	0,5 – 64
EA160	0,5 – 64

IEs: inibidores de efluxo; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil.

2.2.5 Avaliação do efeito dos IEs/novos compostos sobre o valor de CMI de antibióticos e EtBr

O efeito dos inibidores de efluxo e dos novos compostos foi avaliado através da re-determinação de CMI dos antibióticos e EtBr na presença dos mesmos. Para tal, foram preparadas placas de 96 poços conforme descrito no ponto 2.2.4.2. No entanto, previamente ao passo de inoculação foi adicionado a cada poço uma alíquota de 0,01 mL de cada composto de modo a obter uma concentração final equivalente a 1/4 da respetiva CMI.

As placas foram incubadas a 37 °C durante 72 horas e a leitura foi realizada visualmente, sendo a CMI determinada como a menor concentração do agente antimicrobiano para a qual não se observou crescimento. Os valores de CMI obtidos na presença e ausência dos IEs/novos compostos foram comparados, considerando-

se uma redução do valor de CMI em duas diluições na presença do IE/novo composto indicativa de um efeito inibitório de atividade de efluxo por esse composto [25].

2.2.6 Ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”

Os ensaios de sinergismo foram efetuados pelo método de “checkerboard” [42] em placas de 96 poços num volume final de 0,2 mL (Figura 8). Em primeiro lugar, foram efetuadas dez diluições seriadas de cada agente antimicrobiano e seis diluições de cada inibidor de efluxo em meio 7H9, de modo a obter-se soluções com quatro vezes a concentração final pretendida, de 1x CMI até 1/512x CMI ou de 1x CMI até 1/32x CMI, respetivamente. De seguida, deu-se início à preparação das placas de 96 poços, sendo adicionadas alíquotas de 0,1 mL de água bidestilada estéril aos poços exteriores (Figura 8, poços a azul), para minimizar a evaporação do conteúdo da placa. A cada poço da coluna 11 foram adicionados 0,05 mL da solução de agente antimicrobiano mais concentrada, sendo este passo repetido até a coluna 2, com adição sucessiva de 0,05 mL das soluções seriadas previamente preparadas. Do mesmo modo, a cada poço da linha B foi adicionado 0,05 mL da solução de inibidor de efluxo mais concentrada, com repetição deste passo até à linha G, adicionando sucessivamente 0,05 mL das soluções seriadas previamente preparadas do inibidor de efluxo. Por fim, foi adicionado uma alíquota de 0,1 mL de inóculo, descrito no ponto 2.2.4.1, a todos os poços da placa.

Foram igualmente preparados controlos contendo somente agente antimicrobiano ou inibidor de efluxo (0,05 mL de solução) numa placa de 96 poços separada, com adição de 0,05 mL de meio 7H9. As placas foram seladas num saco de plástico (para minimizar evaporação) e incubadas durante um período de 72 horas a 37 °C, sendo a leitura efetuada visualmente e a CMI determinada como a menor concentração de agente antimicrobiano para a qual não se observou crescimento.

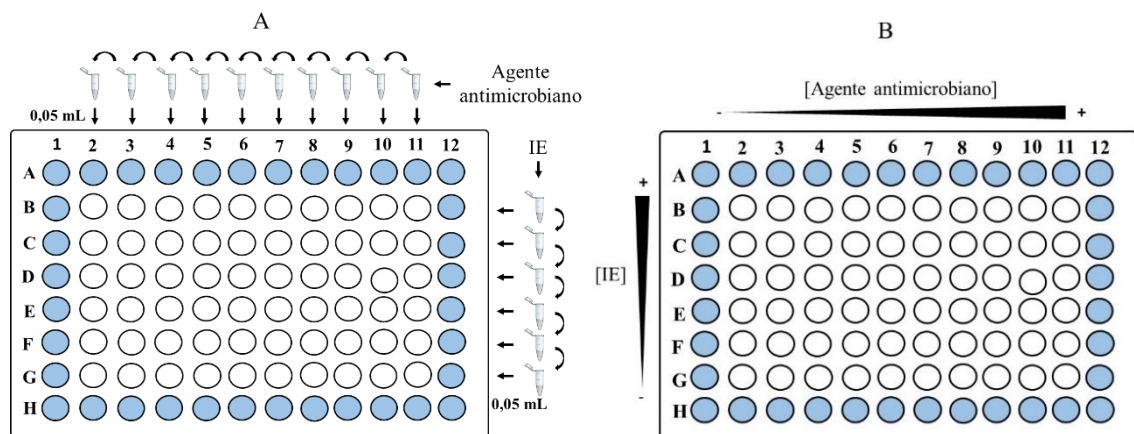


Figura 8. Representação esquemática do modo de preparação de placas de 96 poços para ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard” (A) e distribuição final das concentrações de agente antimicrobiano e inibidor de efluxo (IE) na placa (B). Poços a azul: água bidestilada.

O efeito dos inibidores de efluxo foi avaliado através da determinação dos valores de concentração inibitória fracionária (FIC, do inglês “Fractional Inhibitory Concentration”) de cada agente antimicrobiano pela fórmula seguinte:

$$FIC_{(A)} = \frac{CMI_{(A \text{ na presença de IE})}}{CMI_{(A)}}$$

Equação 2. Expressão matemática para determinação de valores de FIC. $CMI_{(A)}$ corresponde à CMI do agente antimicrobiano A; $CMI_{(A \text{ na presença de IE})}$ corresponde à CMI do agente antimicrobiano na presença de inibidor de efluxo.

Para avaliar o efeito de cada inibidor de efluxo na suscetibilidade a um dado agente antimicrobiano, foi utilizado o critério de Pillai *et al.*, em que um valor de FIC inferior a 0,5 é considerado sinergismo, valores de FIC iguais ou superiores a 4 como antagonismo e valores de FIC entre 0,5 e 2,0, como indiferença [102].

2.2.7 Ensaios de fluorimetria em tempo-real

O efeito dos inibidores de efluxo/novos compostos sobre a atividade de efluxo de *M. smegmatis* foi avaliado pelo método de fluorimetria em tempo-real, desenvolvido no Grupo de Micobactérias da Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical [140]. Neste método, utiliza-se o aparelho Rotor-Gene™ 3000 (Figura

9), acoplado a um “software” de análise em tempo-real (rotor-gene v6.0, Corbett Research) para detecção da fluorescência emitida pelo EtBr (excitação a 530 nm, emissão a 585 nm). Esta molécula é um bom marcador para estudar a atividade de efluxo em bactérias, pois é um substrato comum de bombas de efluxo, e sendo um fluorocromo, emite fluorescência forte quando concentrado no interior da célula bacteriana e fluorescência fraca em meio extracelular [90, 139, 140].

Foram realizados três tipos de ensaios fluorométricos: (1) ensaios de acumulação na presença de concentrações crescentes de EtBr, para determinar a concentração de equilíbrio de EtBr (influxo = efluxo); (2) ensaios de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo/novos compostos, com o objetivo de avaliar o seu efeito na acumulação de EtBr; (3) ensaios de efluxo, com o intuito de avaliar o efeito inibitório dos compostos no efluxo do EtBr. Todos os ensaios foram realizados na presença e ausência de glucose, fonte de energia de sistemas de efluxo, e por conseguinte utilizada para avaliação da dependência energética dos mesmos. Cada ensaio de fluorimetria em tempo-real foi realizado, pelo menos, em duplicado.

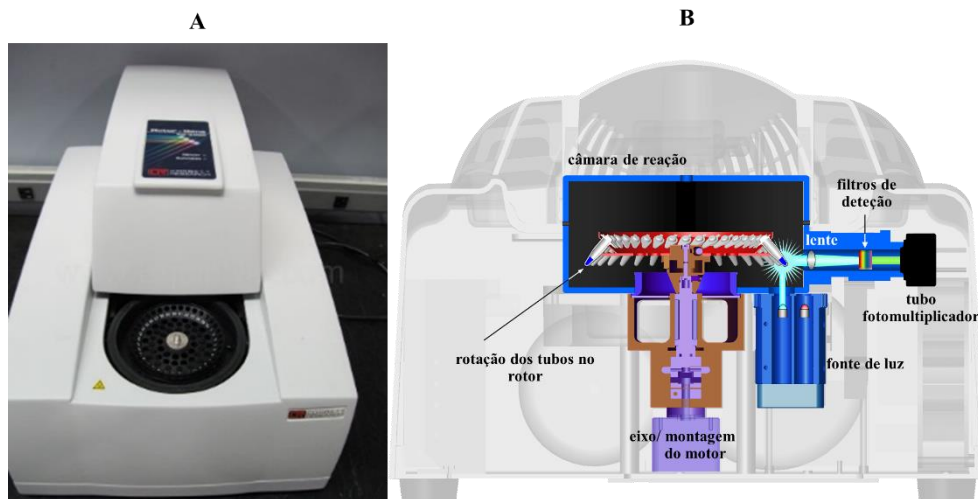


Figura 9. Aspeto exterior de um aparelho Rotor-Gene™ 3000 (A); Representação esquemática do seu interior (B) (<https://www.qiagen.com/media/product-tools/flash/RotorGeneQ/360/index.html>).

2.2.7.1 Ensaios de acumulação

2.2.7.1.1 Preparação do inóculo

Foram preparadas culturas das duas estirpes em estudo de acordo com o descrito no ponto 2.2.1. Uma vez alcançada uma DO₆₀₀ de 0,8, as células foram recolhidas por centrifugação a 3.500 rpm durante 3 minutos à temperatura ambiente numa centrífuga 5810 R (Eppendorf, Alemanha). O sedimento bacteriano foi lavado em 10 mL de PBS e ressuspenso em PBS, de modo a obter uma DO₆₀₀ de 0,8 (para ensaios de acumulação) ou 0,4 (para ensaios de efluxo).

2.2.7.1.2 Ensaios de acumulação de EtBr

Neste ensaio, a capacidade de acumulação de EtBr pelas duas estirpes de *M. smegmatis* foi avaliada na presença de EtBr a concentrações de 0,125 mg/L a 3 mg/L. Para tal, foram preparadas, em tubos de 0,2 mL, as seguintes reações, contendo 0,05 mL de suspensão celular a DO₆₀₀ de 0,8 e:

- i. 0,05 mL PBS (controlo);
- ii. 0,05 mL de EtBr nas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 mg/L;
- iii. 0,05 mL de glucose a 0,8 %;
- iv. 0,05 mL de EtBr nas concentrações de 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 mg/L e 0,05 mL de glucose a 0,8 %;

Assim, em cada tubo, a suspensão celular encontra-se a uma DO₆₀₀ final de 0,4 e a glucose a uma concentração final de 0,4 %. Os tubos foram então colocados no aparelho Rotor-GeneTM 3000 e o sinal de fluorescência do EtBr medido a cada ciclo de 60 segundos durante 60 minutos a 37 °C.

2.2.7.1.3 Ensaios de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo/novos compostos

Os ensaios de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo/novos compostos foram realizados com o objetivo de avaliar a capacidade de promover a

acumulação de EtBr na presença dos mesmos a $\frac{1}{4}$ da sua CMI. Para tal, foram preparadas, em tubos de 0,2 mL, as seguintes reações, contendo 0,05 mL de suspensão celular a DO_{600} e:

- i. 0,05 mL PBS (controlo);
- ii. 0,05 mL de EtBr a 0,25 mg/L (controlo);
- iii. 0,05 mL de EtBr a 0,25 mg/L e inibidor de efluxo/novo composto;
- iv. 0,05 mL glucose a 0,8 % (controlo);
- v. 0,05 mL de EtBr a 0,25 mg/L e glucose a 0,8 % (controlo);
- vi. 0,05 mL de EtBr a 0,25 mg/L, inibidor de efluxo/novo composto e glucose a 0,8%.

Em cada reação, a suspensão celular encontra-se a uma DO_{600} final de 0,4, o EtBr a 0,125 mg/L (concentração de equilíbrio para as duas estirpes), a glucose a uma concentração final de 0,4 % e cada inibidor de efluxo/novo composto a uma concentração final equivalente a $\frac{1}{4}$ da respetiva CMI. Os tubos foram então colocados no aparelho Rotor-GeneTM 3000 e o sinal de fluorescência do EtBr medido a cada ciclo de 60 segundos durante 60 minutos a 37 °C.

A partir dos valores de fluorescência obtidos foram determinados os valores de Fluorescência Final Relativa (RFF, do inglês “Relative Final Fluorescence”). Este parâmetro permite quantificar o efeito de cada inibidor de efluxo/novo composto num mesmo ensaio, assim como em ensaios independentes, sendo determinado pela seguinte fórmula:

$$RFF_{IE/novo\ composto} = \frac{F_{60\ (EtBr + IE/novo\ composto)} - F_{60\ (EtBr)}}{F_{60\ (EtBr)}}$$

Equação 3. Expressão matemática para determinação de valores de RFF. $F_{60\ (EtBr + IE/novo\ composto)}$ corresponde à fluorescência ao minuto 60 na presença EtBr e inibidor de efluxo/novo composto; $F_{60\ (EtBr)}$ corresponde ao valor de fluorescência ao minuto 60 somente na presença de EtBr [77].

2.2.7.2 Ensaios de efluxo

Para estes ensaios é necessária a preparação prévia de células carregadas de EtBr em condições que promovem uma acumulação máxima de EtBr. Para tal, à suspensão celular de DO_{600} de 0,4 (ponto 2.2.7.1.1) foi adicionado EtBr a 0,125 mg/L (concentração de

equilíbrio para as duas estirpes) e verapamil a $\frac{1}{4}$ da sua CMI, uma vez que este é o inibidor de efluxo que promove maior acumulação de EtBr em *M. smegmatis* [139, 140]. A suspensão celular foi então incubada à temperatura ambiente durante 60 minutos. Posteriormente, as células foram recolhidas por centrifugação a 3.500 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em PBS de modo a obter uma suspensão celular com DO₆₀₀ de 0,8. De seguida, foram preparadas, em tubos de 0,2 mL, as seguintes reações, contendo 0,05 mL de suspensão celular a DO₆₀₀ de 0,8 e:

- i. 0,05 mL PBS;
- ii. 0,05 mL de inibidor de efluxo/novo composto;
- iii. 0,05 mL de glucose a 0,8 %;
- iv. 0,05 mL de inibidor de efluxo/novo composto e glucose a 0,8 %.

Assim em cada tubo, a suspensão celular encontra-se a uma DO₆₀₀ final de 0,4, a glucose a uma concentração final de 0,4 % e cada inibidor de efluxo/novo composto a uma concentração final equivalente a $\frac{1}{4}$ da respetiva CMI. Os tubos foram então colocados no aparelho Rotor-Gene™ 3000, e o sinal de fluorescência do EtBr medido a cada ciclo de 30 segundos durante 30 minutos a 37 °C. Os dados obtidos foram normalizados por comparação da fluorescência obtida em cada ponto com a fluorescência obtida nas condições de mínimo de efluxo (presença de verapamil e ausência de glucose) realizadas durante o mesmo ensaio. A fluorescência relativa foi então determinada considerando que em cada unidade de tempo o valor de fluorescência lido no tubo de controlo (efluxo mínimo), equivale ao máximo de fluorescência (definido como 1).

3 RESULTADOS

3.1 Análise do gene *lfrA* da estirpe *M. smegmatis* XZL1675

Para este trabalho foram utilizadas duas estirpes de *M. smegmatis*, a estirpe selvagem mc²155 e a estirpe mutante XZL1675 (mc²155 Δ *lfrA*), que diferem entre si no sistema de efluxo LfrA. Este encontra-se inativado na estirpe mutante XZL1675 por deleção, em extensão não conhecida, no gene *lfrA* [69]. Para analisar a extensão da deleção no gene *lfrA* e assim confirmar a inativação do sistema de efluxo, a sequência nucleotídica de *lfrA* foi analisada na estirpe mutante. Para isso, procedeu-se à amplificação de um fragmento do gene por PCR nas duas estirpes. O fragmento amplificado tem um tamanho expectável de 1.23 kb na estirpe selvagem, mas deverá apresentar um tamanho inferior na estirpe mutante. Na Figura 10.A podem ser observados os produtos de PCR obtidos, tendo sido detetada a amplificação de vários fragmentos para ambas as estirpes. No entanto, na estirpe selvagem foi amplificado um fragmento de tamanho semelhante ao esperado (caixa verde), ausente na estirpe mutante. Nesta estirpe, ao invés, foi observado um fragmento de cerca de 700 pb (caixa vermelha) ausente na estirpe selvagem, possivelmente refletindo uma deleção no gene *lfrA*. Para comprovar esta hipótese, ambas as bandas foram excisadas do gel de agarose, purificadas e analisadas novamente por eletroforese (Figura 10.B).

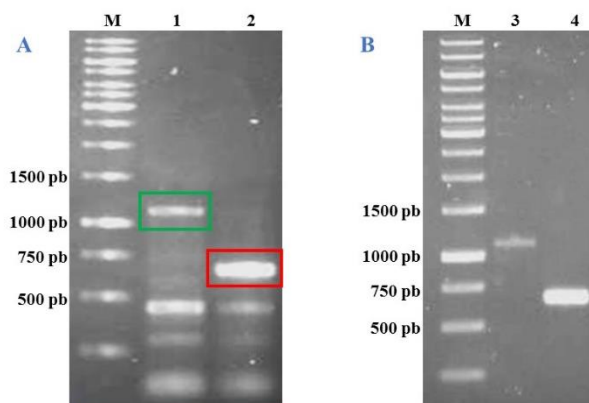


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de PCR de um fragmento do gene *lfrA* (A) e dos fragmentos obtidos após purificação das bandas assinaladas (B). M: marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1: produto de PCR da estirpe mc²155; 2: produto de PCR da estirpe XZL1675; 3: fragmento de 1230 pb purificado da estirpe mc²155; 4: fragmento de cerca de 700 pb purificado da estirpe XZL1675; pb: pares de bases.

O fragmento de cerca de 700 pb obtido para a estirpe XZL1675 foi enviado para sequenciação. A análise da sequência nucleotídica revelou uma deleção de 576 nucleótidos, correspondendo à deleção de 192 aminoácidos, estendendo-se do resíduo 72 ao resíduo 263 na proteína LfrA da estirpe mutante (Figura 11). Confirma-se assim que o gene *lfrA* da estirpe *M. smegmatis* XZL1675 possui uma deleção que muito provavelmente originará uma proteína não funcional.



Figura 11. Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína LfrA das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e XZL1675. O alinhamento foi realizado no programa Clustal Omega, usando a sequência da proteína LfrA do genoma de *M. smegmatis* mc²155 disponível na base de dados GenBank (número de acesso: CP009494.1). As setas indicam o início e o fim da deleção na sequência de aminoácidos da proteína LfrA na estirpe *M. smegmatis* XZL1675.

3.2 Análise da expressão de genes codificantes para bombas de efluxo

Alguns estudos têm demonstrado que quando um sistema de efluxo é inativado/afetado, ocorre uma sobreexpressão de outras bombas de efluxo [40, 56, 74, 138]. Com base nestes estudos, foi avaliada a expressão de genes codificantes para as bombas de efluxo de *M. smegmatis* LfrA, P55, Tap e EfpA e LfrR, repressor transcricional da LfrA. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Quantificação da expressão de genes codificantes para bombas de efluxo na estirpe *M. smegmatis* XZL1675 relativamente à estirpe *M. smegmatis* mc²155.

Estirpe	Níveis de expressão				
	<i>lfrA</i>	<i>lfrR</i>	<i>p55</i>	<i>tap</i>	<i>efpA</i>
XZL1675	0,36 ± 0,50	0,64 ± 0,46	0,42 ± 0,40	0,42 ± 0,55	0,44 ± 0,33

Os valores correspondem à média ± desvio padrão de dois ensaios independentes para o gene *lfrA* e três ensaios independentes para os restantes genes.

3.3 Determinação de concentrações mínimas inibitórias (CMIs)

As CMIs dos antibióticos em estudo, do EtBr e dos IEs foram determinadas para avaliação do perfil de suscetibilidade das estirpes, bem como para definir as concentrações a serem utilizadas nos ensaios seguintes, nomeadamente, determinação de CMIs dos antibióticos e EtBr na presença dos IEs, ensaios de sinergismo por “Checkerboard” e ensaios de fluorometria em tempo-real.

Na Tabela 12 encontram-se os valores de CMIs dos antibióticos e EtBr para as duas estirpes em estudo.

Tabela 12. Valores de CMIs dos antibióticos e EtBr para as duas estirpes de *M. smegmatis* utilizadas neste trabalho.

Antibióticos e EtBr	CMI (mg/L)	
	mc ² 155	XZL1675
CIP	0,25	0,125
OFX	0,5	0,25
ERY	256	256
CLR	8	16
EMB	1	0,5
INH	32	32
RIF	32	4
STR	0,5	0,5
EtBr	12,5	0,5

CMI: concentração mínima inibitória; CIP: ciprofloxacina; OFX: ofloxacina; ERY: eritromicina; CLR: claritromicina; EMB: etambutol; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; INH: isoniazida; EtBr: brometo de etídio.

Observou-se que a estirpe mutante XZL1675 (mc²155 Δ *lfrA*) apresenta, relativamente à estirpe selvagem mc²155, maior suscetibilidade ao EtBr, rifampicina

etambutol e fluoroquinolonas. Em particular, este aumento da suscetibilidade foi superior para o EtBr e rifampicina, o que sugere que estes possam ser melhores substratos da bomba de efluxo LfrA. Este perfil de susceptibilidade apresentado pela estirpe mutante é concordante com estudos previamente publicados [69, 111]. Por outro lado, observou-se uma diminuição da suscetibilidade à claritromicina, contrastando com um estudo anteriormente realizado [111]. Não se registaram diferenças na suscetibilidade à estreptomicina, eritromicina e isoniazida.

A Tabela 13 apresenta os valores de CMIs dos inibidores de efluxo para as estirpes em estudo, assim como a concentração de cada inibidor de efluxo a utilizar nos ensaios seguintes. Observou-se um aumento da susceptibilidade da estirpe XZL1675 para todos os inibidores de efluxo, com uma diminuição das CMIs para metade, em concordância com estudos anteriores [111].

Tabela 13. Valores de CMIs dos inibidores de efluxo para as duas estirpes de *M. smegmatis* e concentrações utilizadas nos ensaios de sinergismo e fluorometria.

IEs	CMI (mg/L)		Concentração IE utilizada [mg/L e (µM)]			
	mc ² 155	XZL1675	mc ² 155		XZL1675	
			½ CMI	¼ CMI	½ CMI	¼ CMI
CPZ	60	30	30 (84,5)	15 (42,25)	15 (42,25)	7,5 (21,125)
TZ	15	7,5	7,5 (18,5)	3,75 (9,25)	3,75 (9,25)	1,88 (4,6)
VP	800	400	400 (814,6)	200 (407,3)	200 (407,3)	100 (203,65)

CMI: concentração mínima inibitória; IE: inibidor de efluxo; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil.

3.4 Avaliação do efeito dos inibidores de efluxo sobre o valor de CMIs de antibióticos e EtBr

De modo a avaliar o efeito dos inibidores de efluxo nas CMIs dos antibióticos e do EtBr foram re-determinadas as CMIs dos mesmos na presença dos inibidores de efluxo a ½ da CMI. Todavia, verificou-se que a esta concentração os inibidores de efluxo interferiam na viabilidade celular das estirpes, não permitindo avaliar o seu efeito. Assim, os ensaios foram realizados a ¼ da CMI, encontrando-se os resultados destes ensaios para as estirpes *M. smegmatis* mc²155 e XZL1675 nas Tabelas 14 e 15, respetivamente.

De um modo geral, para a estirpe mc²155, os três inibidores de efluxo promoveram uma redução dos valores de CMI dos antibióticos e EtBr, embora somente significativa para o EtBr (principalmente na presença de verapamil), eritromicina e claritromicina. Por sua vez, nenhum efeito foi observado na CMI da ofloxacina, enquanto a CMI do etambutol aumentou para o dobro ou quádruplo na presença de clorpromazina, verapamil ou tioridazina, respectivamente.

Tabela 14. Valores de CMIs dos antibióticos e EtBr para a estirpe mc²155 na presença dos inibidores de efluxo CPZ, TZ e VP a ¼ da CMI.

Antibióticos e EtBr	CMI (mg/L) para mc ² 155			
	sem IE	CPZ ¼ CMI	TZ ¼ CMI	VP ¼ CMI
CIP	0,25	0,125 (↓2x)	0,125 (↓2x)	0,125 (↓2x)
OFX	0,5	0,5 (-)	0,5 (-)	0,5 (-)
ERY	256	64 (↓4x)	64 (↓4x)	64 (↓4x)
CLR	8	2 (↓4x)	2 (↓4x)	2 (↓4x)
EMB	1	>2 (>↑2x)	2 (↑2x)	>2 (>↑2x)
RIF	16	16 (-)	16 (-)	8 (↓2x)
STR	0,5	0,25 (↓2x)	0,125 (↓4x)	0,25 (↓2x)
INH	32	16 (↓2x)	16 (↓2x)	32 (-)
EtBr	12,5	3,13 (↓4x)	3,13 (↓4x)	0,78 (↓16x)

CMI: concentração mínima inibitória; IE: inibidor de efluxo; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil; CIP: ciprofloxacina; OFX: ofloxacina; ERY: eritromicina; CLR: claritromicina; EMB: etambutol; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; INH: isoniazida; EtBr: brometo de etídio; ↓ redução de CMI; ↑ aumento de CMI; (-) sem efeito. Os valores a negrito indicam uma redução de CMI ≥ 4x.

Em relação à estirpe XZL1675, os três inibidores de efluxo promoveram uma redução menos significativa das CMIs, sendo apenas observada uma redução da CMI para um quarto do valor original para a claritromicina na presença da clorpromazina e verapamil. Para a rifampicina, todos os inibidores de efluxo reduziram o valor de CMI para metade, enquanto para a estreptomicina e EtBr, este efeito foi apenas observado na

presença de clorpromazina e verapamil. Para os restantes antibióticos não foi observado qualquer efeito, à excepção da eritromicina na presença de verapamil. Tal como observado para a estirpe mc²155, foi registado um aumento da CMI do etambutol na presença de todos os inibidores de efluxo.

Tabela 15. Valores de CMIs dos antibióticos e EtBr para a estirpe XZL1675 na presença dos inibidores de efluxo CPZ, TZ e VP a ¼ da CMI.

Antibióticos e EtBr	CMI (mg/L) para XZL1675			
	sem IE	CPZ ¼ CMI	TZ ¼ CMI	VP ¼ CMI
CIP	0,125	0,125 (-)	0,125 (-)	0,125 (-)
OFX	0,25	0,25 (-)	0,25 (-)	0,25 (-)
ERY	256	256 (-)	256 (-)	128 (↓2x)
CLR	16	4 (↓4x)	8 (↓2x)	4 (↓4x)
EMB	0,5	2 (↑4x)	2 (↑4x)	2 (↑4x)
RIF	4	2 (↓2x)	2 (↓2x)	2 (↓2x)
STR	0,5	0,25 (↓2x)	0,5 (-)	0,25 (↓2x)
INH	32	32 (-)	16 (↓2x)	16 (↓2x)
EtBr	0,5	0,25 (↓2x)	0,5 (-)	0,25 (↓2x)

CMI: concentração mínima inibitória; IE: inibidor de efluxo; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil; CIP: ciprofloxacina; OFX: ofloxacina; ERY: eritromicina; CLR: claritromicina; EMB: etambutol; RIF: rifampicina; STR: estreptomicina; INH: isoniazida; EtBr: brometo de etídio; ↓ redução de CMI; ↑ aumento de CMI; (-) sem efeito. Os valores a negrito indicam uma redução de CMI ≥ 4x.

Resumindo, o verapamil foi o inibidor de efluxo que demonstrou maior capacidade de redução de CMIs dos vários antibióticos em estudo e do EtBr. Entre as fenotiazinas, a clorpromazina promoveu uma maior redução de CMIs do que a tioridazina. De um modo geral, este efeito de redução de CMIs foi menos significativa para a estirpe mutante XZL1675.

3.5 Ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”

De modo a detetar um possível efeito sinérgico dos inibidores de efluxo com os antibióticos em estudo e o EtBr, foram realizados ensaios de sinergismo pelo método de “Checkerboard”. O efeito dos inibidores de efluxo foi classificado de acordo com o valor de FIC, como definido por Pillai *et al.*, considerando que um valor $FIC < 0,5$ corresponde a sinergismo, um valor de $FIC \geq 4$ corresponde a antagonismo, e valores de FIC entre 0,5 e 2,0 correspondem a indiferença [102].

Na Figura 12 e Tabela 16 encontram-se os resultados dos ensaios de sinergismo com os macrólidos **eritromicina** e **claritromicina** e o **EtBr** para ambas as estirpes de *M. smegmatis*.

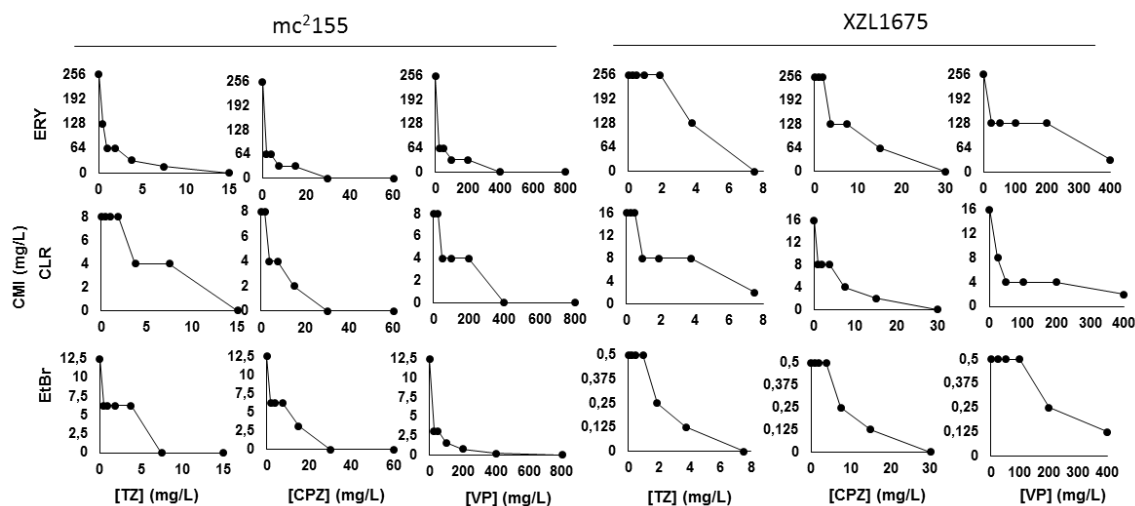


Figura 12. Representação gráfica do efeito exercido pelos três inibidores de efluxo sobre os valores de CMIs da eritromicina (ERY), claritromicina (CLR) e brometo de etídio (EtBr), para as duas estirpes de *M. smegmatis* em estudo.

Tabela 16. Efeito dos inibidores de efluxo nos valores de CMIs (mg/L) da eritromicina, claritromicina e EtBr e respectivos valores de FIC para as duas estirpes de *M. smegmatis* em estudo.

[IEs] (x CMI)	CMI (mg/L) para mc ² 155									CMI (mg/L) para XZL1675								
	ERY			CLR			EtBr			ERY			CLR			EtBr		
	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP
1	<0,5	<0,5	<0,5	<0,0156	<0,0156	<0,156	<0,188	<0,188	<0,188	<0,5	<0,5	<0,5	2	<0,031	<0,031	0,0625	<0,002	<0,002
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(0,125)	(-)	(-)	(0,125)	(-)	(-)
$\frac{1}{2}$	16	<2	<2	4	<0,0156	<0,156	6,25	<0,188	0,195	128	64	32	8	2	2	0,0625	0,125	0,125
	(0,0625)	(-)	(-)	(0,5)	(-)	(-)	(0,5)	(-)	(0,016)	(0,5)	(0,25)	(0,125)	(0,5)	(0,125)	(0,125)	(0,125)	(0,25)	(0,25)
$\frac{1}{4}$	32	32	32	4	2	4	6,25	3,1	0,75	256	128	128	8	4	4	0,5	0,25	0,25
	(0,125)	(0,125)	(0,125)	(0,5)	(0,25)	(0,5)	(0,5)	(0,25)	(0,06)	(1)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(0,25)	(0,25)	(1)	(0,5)	(0,5)
$\frac{1}{8}$	64	32	32	8	4	4	6,25	6,25	1,56	256	128	128	8	8	4	0,5	0,5	0,5
	(0,25)	(0,125)	(0,125)	(1)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(0,125)	(1)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(0,25)	(1)	(1)	(1)
$\frac{1}{16}$	64	64	64	8	4	4	6,25	6,25	3,13	256	256	128	16	8	4	0,5	0,5	0,5
	(0,25)	(0,25)	(0,125)	(1)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(0,25)	(1)	(1)	(0,5)	(1)	(0,5)	(0,25)	(1)	(1)	(1)
$\frac{1}{32}$	128	64	64	8	8	8	6,25	6,25	3,13	256	256	128	16	8	8	0,5	0,5	0,5
	(0,5)	(0,25)	(0,25)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,5)	(0,25)	(1)	(1)	(0,5)	(1)	(0,5)	(0,5)	(1)	(1)	(1)
sem IE	256			8			12,5			256			16			0,5		

CMI: concentração mínima inibitória; FIC: concentração inibitória fracionária; IE: inibidor de efluxo; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil; ERY: eritromicina; CLR: claritromicina; EtBr: brometo de etídio. Os valores entre parênteses correspondem aos valores de FIC. Os valores a negrito indicam um valor de FIC < 0,5 correspondente a sinergismo.

Pela análise da Figura 12 e da Tabela 16, foi observado um efeito sinérgico significativo dos inibidores de efluxo com a eritromicina e o EtBr; para a claritromicina, este efeito sinérgico foi menos significativo e observado apenas na estirpe XZL1675.

Por sua vez, os resultados dos ensaios de sinergismo para as duas fluoroquinolonas **ciprofloxacina** e **ofloxacina**, assim como para a **estreptomicina** encontram-se na Figura 13 e Tabela 17.

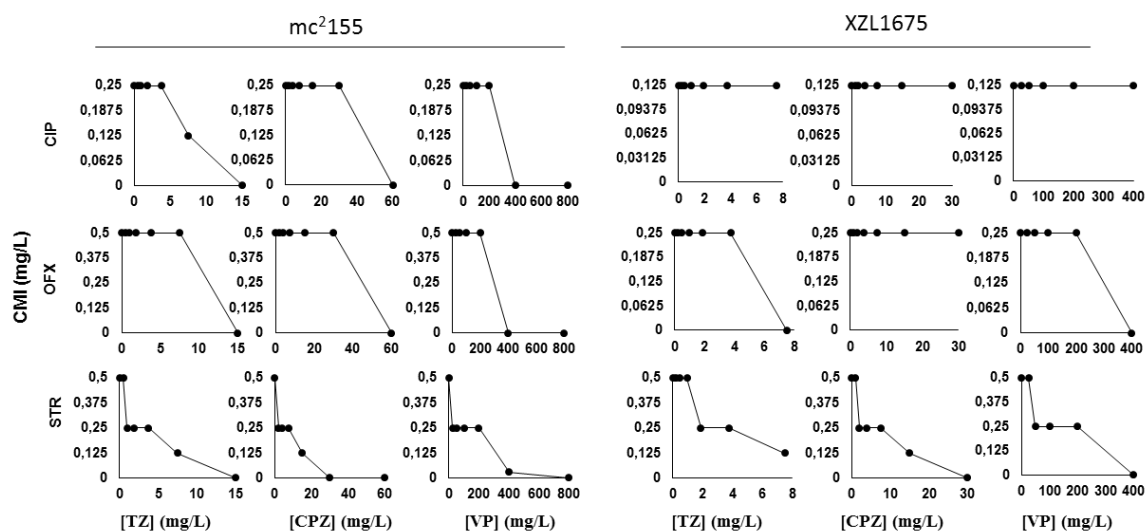


Figura 13. Representação gráfica do efeito exercido pelos três inibidores de efluxo sobre os valores de CMIs da ciprofloxacina (CIP), ofloxacina (OFX) e estreptomicina (STR) para as duas estirpes de *M. smegmatis* em estudo.

Pela análise da Figura 13 e da Tabela 17, observa-se um fraco efeito sinérgico dos inibidores de efluxo com a estreptomicina em ambas as estirpes, enquanto nenhum efeito foi registado com as fluoroquinolonas ciprofloxacina e ofloxacina.

Tabela 17. Efeito dos inibidores de efluxo nos valores de CMI (mg/L) da ciprofloxacina, ofloxacina e estreptomicina e respectivos valores de FIC para as duas estirpes de *M. smegmatis* em estudo.

[IEs] (x CMI)	CMI (mg/L) para mc ² 155									CMI (mg/L) para XZL1675								
	CIP			OFX			STR			CIP			OFX			STR		
	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP
1	<0,004	<0,004	<0,004	0,25	<0,004	<0,004	<0,004	<0,004	<0,004	0,125	0,125	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	0,125	<0,004	<0,004
	(-)	(-)	(-)	(0,5)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(1)	(1)	(-)	(-)	(-)	(-)	(0,125)	(-)	(-)
$\frac{1}{2}$	0,125	0,25	<0,004	0,5	0,5	<0,004	0,125	<0,004	0,03	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125
	(0,5)	(1)	(-)	(1)	(1)	(-)	(0,25)	(-)	(0,06)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,25)	(0,25)
$\frac{1}{4}$	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,125	0,25	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,25)	(0,5)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,5)	(0,5)
$\frac{1}{8}$	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,5)
$\frac{1}{16}$	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,5)
$\frac{1}{32}$	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5
	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,5)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
sem IE	0,25			0,5			0,5			0,125			0,25			0,5		

CMI: concentração mínima inibitória; FIC: concentração inibitória fracionária”; IE: inibidor de efluxo; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil; CIP: ciprofloxacina; OFX: ofloxacina; STR: estreptomicina. Os valores entre parênteses correspondem aos valores de FIC. Os valores a negrito indicam um valor de FIC < 0,5 correspondente a sinergismo.

Os resultados dos ensaios de sinergismo efetuados para os restantes antibióticos, nomeadamente **rifampicina**, **isoniazida** e **etambutol** encontram-se na Figura 14 e Tabela 18.

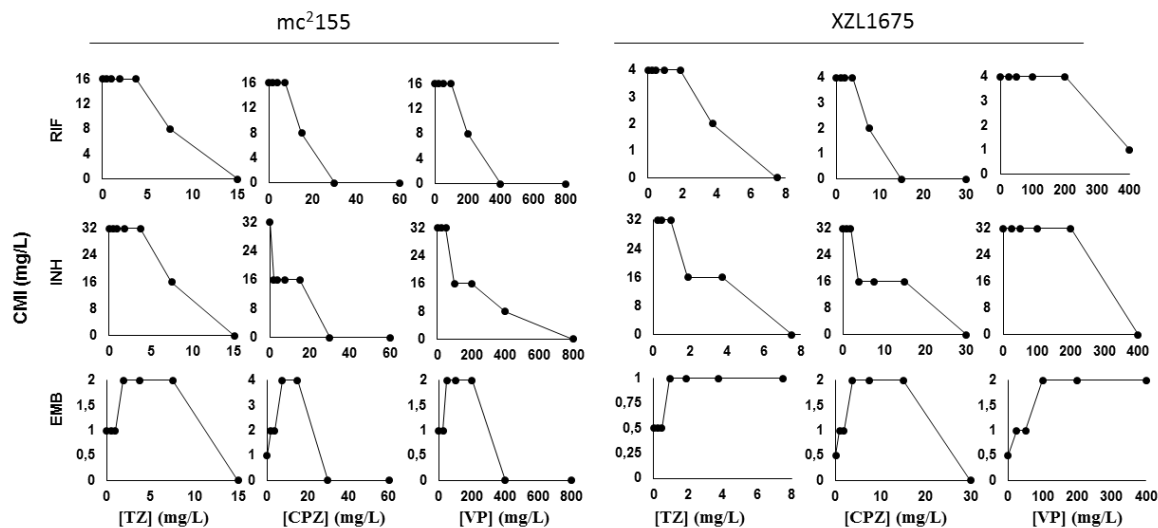


Figura 14. Representação gráfica do efeito exercido pelos três inibidores de efluxo sobre os valores de CMIs da rifampicina (RIF), isoniazida (INH) e etambutol (EMB) para as duas estirpes de *M. smegmatis* em estudo.

Relativamente ao efeito dos inibidores de efluxo com estes três antibióticos, foi observado um fraco efeito sinérgico com a rifampicina e isoniazida, mais evidente para a estirpe mc²155. Pelo contrário, os três inibidores de efluxo mostraram exercer um efeito antagónico com o etambutol em ambas as estirpes.

Tabela 18. Efeito dos inibidores de efluxo nos valores de CMI (mg/L) da rifampicina, isoniazida e etambutol e respectivos valores de FIC para as duas estirpes de *M. smegmatis* em estudo.

[IEs] (x CMI)	CMI (mg/L) para mc ² 155									CMI (mg/L) para XZL1675								
	RIF			INH			EMB			RIF			INH			EMB		
	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP	TZ	CPZ	VP
1	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125	<0,03	<0,03	<0,03	<0,0078	<0,0078	<0,0078	<0,125	<0,125	<0,125	1	<0,0078	<0,0078
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(2)	(-)	(-)
$\frac{1}{2}$	8	<0,125	<0,125	16	<0,125	<0,125	2	<0,03	<0,03	2	0,5	1	16	16	8	1	2	2
	(0,5)	(-)	(-)	(0,5)	(-)	(-)	(2)	(-)	(-)	(0,5)	(0,125)	(0,25)	(0,5)	(0,5)	(0,25)	(2)	(4)	(4)
$\frac{1}{4}$	16	8	8	32	16	32	2	4	2	4	2	4	16	16	16	1	2	2
	(1)	(0,5)	(0,5)	(1)	(0,5)	(1)	(2)	(4)	(2)	(1)	(0,5)	(1)	(0,5)	(0,5)	(0,5)	(2)	(4)	(4)
$\frac{1}{8}$	16	16	16	32	16	32	2	4	2	4	4	4	32	16	16	1	2	2
	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(1)	(2)	(4)	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(0,5)	(2)	(4)	(4)
$\frac{1}{16}$	16	16	16	32	16	32	1	2	2	4	4	4	32	32	32	0,5	1	1
	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(1)	(1)	(2)	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(2)	(2)
$\frac{1}{32}$	16	16	16	32	16	32	1	2	1	4	4	4	32	32	16	0,5	1	1
	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(1)	(1)	(2)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(0,5)	(1)	(2)	(2)
sem IE	16			32			1			4			32			0,5		

CMI: concentração mínima inibitória; FIC: concentração inibitória fracionária; IE: inibidor de efluxo; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil; RIF: rifampicina, INH: isoniazida; EMB: etambutol. Os valores entre parênteses correspondem ao valores de FIC. Os valores a negrito indicam um valor de FIC < 0,5 correspondente a sinergismo.

Resumindo, o verapamil foi o inibidor de efluxo que exerceu maior efeito sinérgico com os antibióticos, particularmente os macrólidos eritromicina e claritromicina e com o EtBr. Este efeito sinérgico foi também observado para as duas fenotiazinas testadas, embora menos evidente. Por outro lado, este sinergismo foi menos significativo na estirpe XZL1675, relativamente à estirpe mc²155, provavelmente resultado de uma menor capacidade de efluxo devido à inativação do sistema de efluxo LfrA.

3.6 Avaliação da atividade de efluxo por fluorometria

3.6.1 Ensaios de acumulação de EtBr

Os ensaios de fluorometria permitem avaliar em tempo-real a atividade de efluxo de uma dada estirpe, assim como avaliar o efeito de um dado composto sobre essa atividade. Para tal, é necessário efetuar um primeiro ensaio de acumulação com concentrações crescentes de EtBr para determinar a concentração de equilíbrio entre o influxo e o efluxo de EtBr para cada uma das estirpes em estudo. Este valor de concentração foi utilizado posteriormente para a realização de ensaios de acumulação de EtBr na presença dos inibidores de efluxo clorpromazina, tioridazina e verapamil, com o objetivo de avaliar a sua capacidade de inibição de efluxo do EtBr. Todos os ensaios foram realizados na presença e ausência de glucose como fonte de energia para a avaliação da dependência energética dos sistemas de efluxo.

Na Figura 15 são apresentados gráficos representativos dos resultados obtidos nos ensaios de acumulação com concentrações crescentes de EtBr para as duas estirpes em estudo.

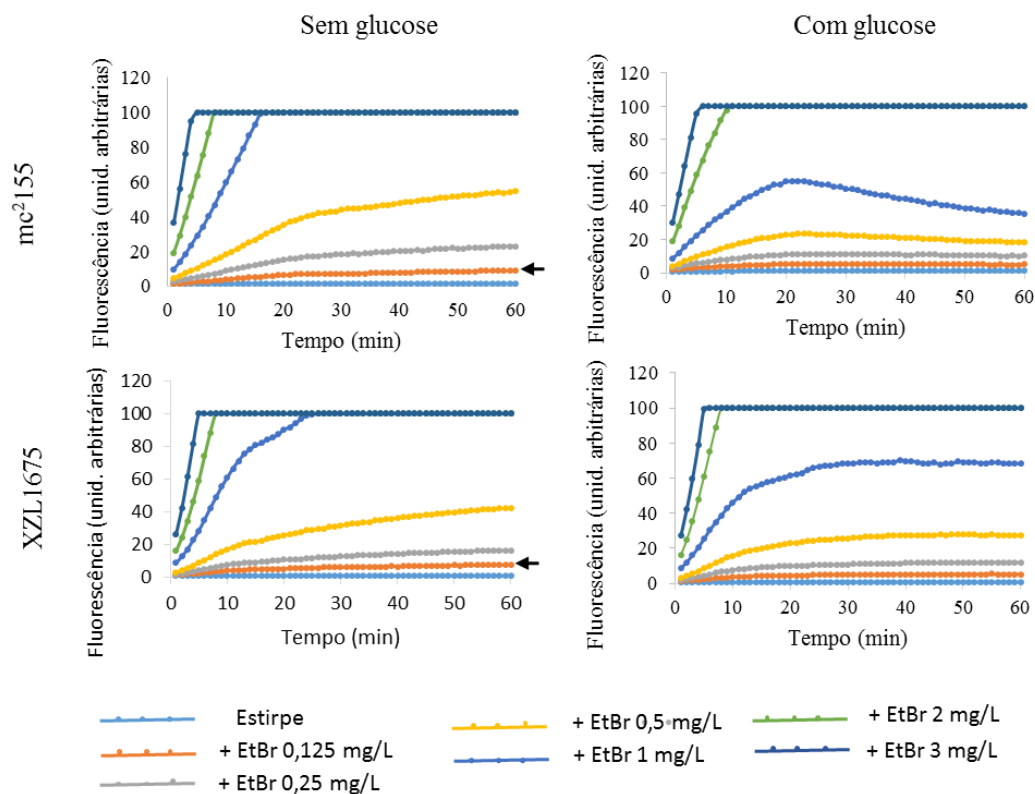


Figura 15. Ensaios de acumulação com concentrações crescentes (0,125 - 3 mg/L) de EtBr na ausência e presença 0,4% de glucose para as duas estirpes de *M. smegmatis*. A seta indica a curva da concentração de EtBr (0,125 mg/L) selecionada para posterior avaliação do efeito dos inibidores de efluxo na acumulação de EtBr. EtBr: brometo de etídio; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil.

Nestes ensaios, foi possível observar que ambas as estirpes apresentam a mesma concentração de equilíbrio (influxo = efluxo) de EtBr, 0,125 mg/L, como evidenciada pelas setas na Figura 15. Ao contrário do esperado, não foram observadas diferenças significativas na acumulação de EtBr entre as duas estirpes na ausência de glucose. No entanto, na presença de glucose, foi detetado um aumento da acumulação de EtBr na estirpe XZL1675 (mc²155 $\Delta lfrA$), em comparação com a estirpe selvagem, na concentração de 1 mg/L. Estes resultados sugerem que ambas as estirpes apresentam uma actividade de efluxo comparável, embora superior na estirpe selvagem.

3.6.2 Ensaios de acumulação de EtBr na presença de inibidores de efluxo

Para a avaliação do efeito de inibidores de efluxo na acumulação de EtBr, foram realizados ensaios de acumulação na presença destes IEs a 1/4 da CMI (Tabela 12). De modo a ser possível comparar e quantificar o efeito de cada inibidor no mesmo ensaio ou

entre diferentes ensaios, foram calculados valores de RFF (ver Materiais e Métodos, ponto 2.2.7.1.3). Na Figura 16 apresentam-se gráficos representativos dos resultados obtidos nestes ensaios para as duas estirpes em estudo.

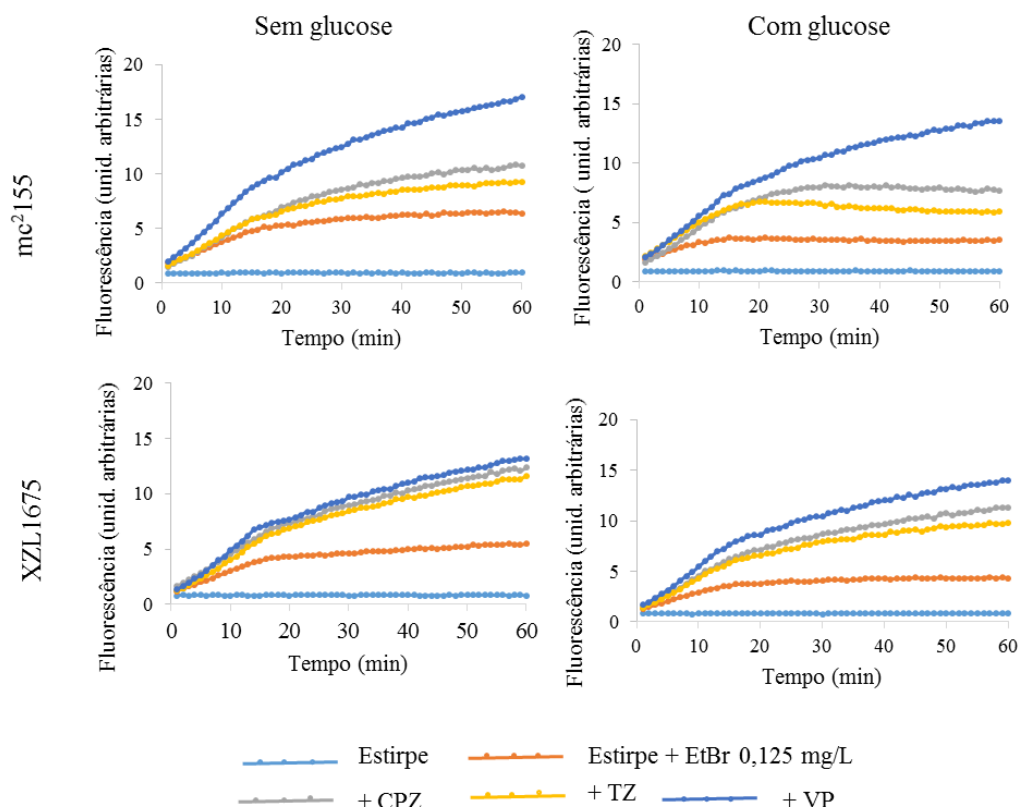


Figura 16. Ensaio de acumulação de EtBr [0,125mg/L] para as duas estirpes de *M. smegmatis* na presença de inibidores de efluxo a ¼ da CMI e na ausência e presença de 0,4 % glucose. CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil. Os IEs foram utilizados a ¼ de CMI, nomeadamente: para mc²155 CPZ 15 mg/L, TZ 3,75 mg/L, VP 200 mg/L e para XZL1675 CPZ 7,5 mg/L, TZ 1,88 mg/L, VP 100 mg/L.

Os gráficos apresentados na Figura 16 evidenciam maior acumulação de EtBr na presença de todos os inibidores de efluxo em relação ao controlo (estirpe + EtBr). Todavia, o verapamil foi o inibidor de efluxo que apresentou um maior efeito na acumulação de EtBr. Estes resultados são suportados pelos valores de RFF apresentados na Tabela 19, em que o verapamil apresentou valores superiores aos da clorpromazina e tioridazina. Para além disso, é possível observar um menor efeito da glucose sobre os valores de RFF relativos ao verapamil.

Tabela 19. Valores de RFF dos inibidores de efluxo na ausência e presença de glucose 0,4 % para as duas estirpes de *M. smegmatis*. Os valores de RFF foram calculados com base na equação descrita nos Materiais e Métodos, 2.2.7.1.3.

IEs (¼ CMI)	RFF			
	mc ² 155		XZL1675	
	sem glucose	com glucose	sem glucose	com glucose
CPZ	0,69 ± 0,01	1,78 ± 0,85	0,85 ± 0,36	1,40 ± 0,24
TZ	0,44 ± 0,01	1,09 ± 0,57	0,81 ± 0,28	1,00 ± 0,41
VP	1,69 ± 0,02	3,54 ± 0,99	1,04 ± 0,33	1,92 ± 0,33

IE: inibidor de efluxo; RFF: “relative final fluorescence”; CMI: concentração mínima inibitória; EtBr: brometo de etídio; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil. Os valores de RFF correspondem à média ± desvio padrão de dois ensaios independentes para a estirpe mc²155 e de três ensaios independentes para a estirpe XZL1675.

Em suma, a partir destes ensaios é possível ordenar os três inibidores de efluxo consoante o seu efeito de inibição da atividade de efluxo em *M. smegmatis* na ordem TZ<CPZ<VP, quando comparados a ¼ da CMI. Tal como esperado, o efeito inibitório do verapamil no efluxo de EtBr é mais notório para a estirpe selvagem mc²155, quer na ausência ou presença de glucose.

3.6.3 Ensaios de efluxo

Por último, foram realizados ensaios de efluxo de EtBr, nos quais o verapamil, como o inibidor de efluxo que promove maior acumulação intracelular de EtBr (Figura 16), foi o composto escolhido para obter células carregadas com EtBr (ver Materiais e Métodos, ponto 2.2.7.2). A Figura 17 apresenta gráficos representativos de ensaios de efluxo para as duas estirpes.

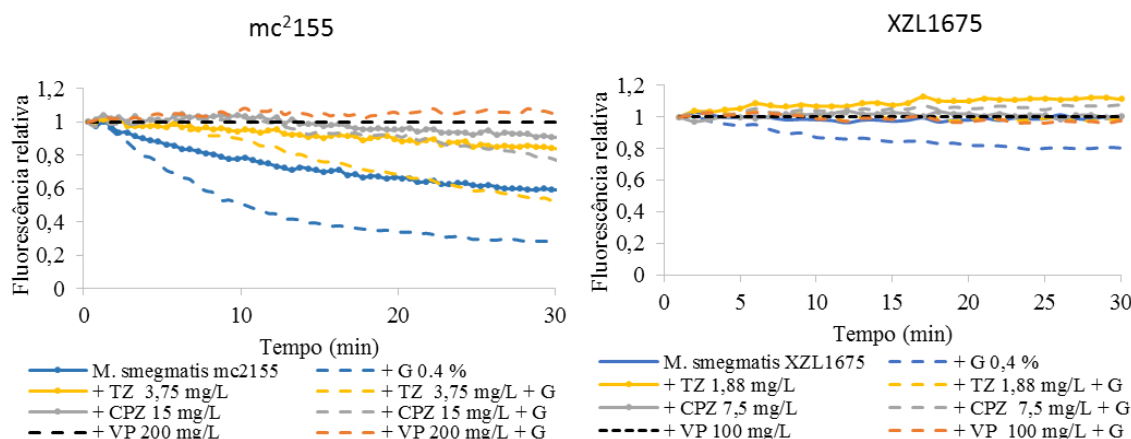


Figura 17. Ensaio de efluxo de EtBr [0,125 mg/L] na presença dos inibidores de efluxo a ¼ da CMI e na ausência e presença de 0,4% glucose para as duas estirpes de *M. smegmatis*. EtBr: brometo de etídio; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil.

Da análise destes gráficos e conforme esperado, a estirpe selvagem mc²155 apresentou uma atividade de efluxo de EtBr superior à estirpe da estirpe XZL1675, corroborando a inativação do sistema de efluxo LfrA na estirpe mutante. Relativamente aos inibidores de efluxo observa-se uma maior atividade inibitória de efluxo pelo verapamil relativamente aos restantes inibidores de efluxo testados, clorpromazina e tioridazina.

3.7 Construção de um modelo de rastreio de novos compostos com potencial atividade antimicobacteriana e/ou inibitória de efluxo

Com base nos resultados acima apresentados, foi desenhado um fluxograma para o rastreio e identificação de novos compostos com potencial atividade antimicobacteriana e/ou inibitória de efluxo em micobactérias. O modelo proposto permite classificar novos compostos em estudo em quatro categorias: (i) compostos com potencial ação antimicobacteriana; compostos com potencial ação adjuvante de outros antimicobacterianos, dentro dos quais distinguimos (ii) potenciais inibidores de efluxo e (iii) potenciais adjuvantes por outros mecanismos que não a inibição de efluxo e (iv) compostos sem atividade relevante (Figura 18). Este fluxograma é proposto usando somente *M. smegmatis* mc²155 como estirpe modelo, uma vez que esta apresenta uma atividade de efluxo superior à da estirpe mutante e que o marcador de efluxo utilizado é o brometo de etídio, substrato do sistema de efluxo LfrA, que se encontra inativado na estirpe *M. smegmatis* XZL1675.

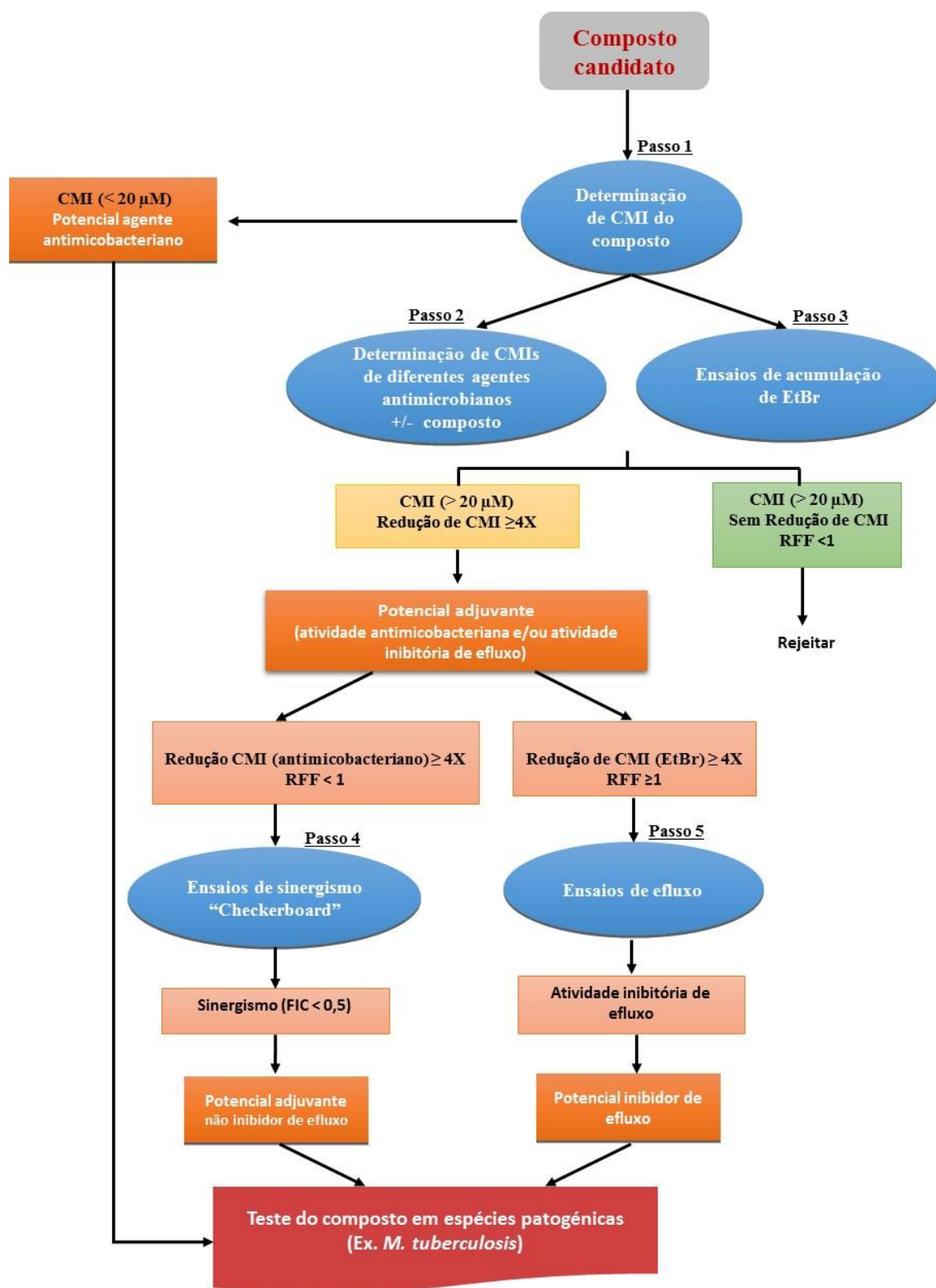


Figura 18. Fluxograma representando o modelo de rastreio e identificação de novos compostos com potencial atividade antimicrobacteriana e/ou adjuvante, incluindo atividade inibitória de efluxo. CMI: concentração mínima inibitória; EtBr: brometo de etídio; RFF: fluorescência relativa final, ("relative final fluorescence"); FIC: concentração inibitória fracionária ("fractional inhibitory concentration").

O modelo consiste num passo inicial de determinação dos valores de CMI dos novos compostos (Figura 18, **Passo 1**), onde é possível classificar os compostos em dois grupos. Compostos que apresentem CMIs baixas ($\leq 20 \mu\text{M}$) são classificados como potenciais antimicobacterianos e podem ser testados em modelos de micobactérias patogénicas; compostos com CMIs elevadas ($> 20 \mu\text{M}$) não terão, à partida, atividade antimicobacteriana considerável. Para este segundo grupo avalia-se de seguida a sua capacidade de redução de CMI de antibióticos relevantes e do EtBr (Figura 18, **Passo 2**), em paralelo com a realização de ensaios de acumulação de EtBr para avaliação da atividade de inibição de efluxo (Figura 18, **Passo 3**). Neste ponto do protocolo, é possível classificar os compostos do segundo grupo em duas categorias: (i) um composto que apresente uma CMI alta e que possua uma capacidade significativa de redução de CMIs dos antibióticos e do EtBr (redução $\geq 4\text{X}$) é classificada como potencial adjuvante, (ii) compostos com CMIs elevadas, que não possuam capacidade de redução de CMIs de outros agentes e um valor de RFF baixo, à partida não terão atividade relevante e o seu estudo será descontinuado.

Um potencial adjuvante que diminua significativamente ($\geq 4\text{X}$) a CMI de diversos antibióticos e um valor de RFF baixo (definido como < 1), será um potencial adjuvante e prosseguirá para ensaios de sinergismo (Figura 18, **Passo 4**). Por outro lado, um composto com CMI alta, capaz de reduzir significativamente ($\geq 4\text{X}$) a CMI do EtBr e com um RFF alto (definido como ≥ 1), será um potencial adjuvante com atividade inibitória de efluxo. Este composto prosseguirá para a ensaios de efluxo (Figura 18, **Passo 5**) para confirmação da sua atividade inibitória de efluxo.

Após estes ensaios (**Passos 4 e 5**), os compostos que demonstrarem uma ação sinérgica ($\text{FIC} < 0,5$) serão classificados como potenciais adjuvantes e poderão ser testados em micobactérias patogénicas, nomeadamente *M. tuberculosis*, enquanto aqueles que demonstrarem uma atividade inibitória de efluxo, serão classificados como potenciais inibidores de efluxo, e poderão ser testados também em micobactérias patogénicas.

Como já referido, este modelo foi otimizado através do estudo da interação entre agentes antimicrobianos relevantes com os inibidores de efluxo conhecidos e ensaios de fluorimetria (pontos 3.3 a 3.6). De acordo com o fluxograma proposto (Figura 18) e os dados obtidos para os três inibidores de efluxo em estudo, o verapamil é um potencial inibidor de efluxo apresentando capacidade de redução de CMI do EtBr e um valor de

RFF > 1. Por sua vez, as fenotiazinas, foram classificadas como potenciais adjuvantes uma vez que reduziram as CMI de antibióticos e apresentaram valores de RFF < 1. Estes resultados evidenciam a eficácia do modelo para a identificação de novos compostos com potencial atividade antimicobacteriana e/ou inibitória de efluxo.

3.8 Aplicação do modelo para a avaliação de novos compostos

Após a construção e validação do modelo apresentado na Figura 18, este foi aplicado no estudo de três novos compostos, um fenilimidazolo (Q-15.252), e dois tiazóisoxazolos (EA156 e EA160), desenhados e sintetizados por um grupo colaborador, como possíveis agentes antimicobacterianos ou inibidores de efluxo.

3.8.1 Determinação de CMIs dos novos compostos

A avaliação dos novos compostos foi iniciada com a determinação dos seus valores de CMIs (Figura 18, **Passo 1**) para a estirpe mc²155, apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Valores de CMIs dos novos compostos para a estirpe de *M. smegmatis* mc²155 e concentrações utilizadas nos ensaios de sinergismo e fluorimetria.

Composto	CMI [mg/L (μM)]	Concentração utilizada	
		½ CMI	¼ CMI
Q- 15.252	8 (19,5)	4 (9,75)	2 (4,88)
EA156	>64 (>166,6)	--	32(83,3)
EA160	>64 (>130,8)	--	32 (65,4)

CMI: concentração mínima inibitória. -- concentração não utilizada.

O composto Q-15.252 apresentou uma CMI de 8 mg/L (19.5 μM), um valor considerado baixo e que sugere atividade antimicobacteriana. Os compostos EA156 e EA160 apresentaram CMIs superiores a 64 mg/L (maior concentração testada devido a problemas de solubilidade) e portanto não possuem atividade antimicobacteriana.

3.8.2 Determinação de CMIs de antibióticos e EtBr na presença dos novos compostos

A avaliação da capacidade de redução de CMIs dos antibióticos e EtBr (Figura 18, **Passo 2**) foi realizada apenas para o composto Q-15.252 (Tabela 21), pois apenas este foi disponibilizado para este trabalho em quantidade suficiente.

Não se observou qualquer efeito do composto Q-15.252 (a $\frac{1}{4}$ da CMI) nos valores de CMIs dos antibióticos e EtBr. Por essa razão, o composto foi testado a concentrações mais altas, nomeadamente a $\frac{1}{2}$ da CMI para três antibióticos representativos (ciprofloxacina, eritromicina e estreptomicina) e para o EtBr - Tabela 21.

Tabela 21. Valores de CMIs dos antibióticos e EtBr na presença do composto Q-15.252 a $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da CMI para a estirpe mc²155.

Antibióticos e EtBr	CMIs (mg/L)		
	Sem composto	+ Q-15.252 ($\frac{1}{4}$ CMI)	+ Q-15.252 ($\frac{1}{2}$ CMI)
CIP	0,25	0,25 (-)	0,25 (-)
OFX	0,5	0,5 (-)	nd
ERY	128	128 (-)	128 (-)
CLR	8	8 (-)	nd
RIF	32	32 (-)	nd
EMB	1	1 (-)	nd
STR	0,5	0,5 (-)	0,5 (-)
EtBr	12,5	12,5 (-)	6,25 (↓2x)

CMI: concentração mínima inibitória; CIP: ciprofloxacina; OFX: ofloxacina; ERY: eritromicina; CLR: claritromicina; RIF: rifampicina; EMB: etambutol; STR: estreptomicina; EtBr: brometo de etídio; ↓ redução de CMI; (-) sem redução de CMI; nd: não determinado.

Pelos resultados apresentados na Tabela 21, conclui-se que Q-15.252 não afeta significativamente as CMIs dos antibióticos testados e do EtBr, uma vez que apenas se observou uma redução ligeira de CMI (2x) do EtBr na presença deste composto a $\frac{1}{2}$ da CMI.

3.8.3 Ensaios de acumulação de EtBr na presença dos novos compostos

Foram realizados ensaios de acumulação de EtBr na presença dos três novos compostos a ¼ da CMI (Figura 18, **Passo 3**), de modo a avaliar a sua capacidade inibitória de efluxo, juntamente com a clorpromazina, tioridazina e verapamil, utilizados como controlos (Figura 19).

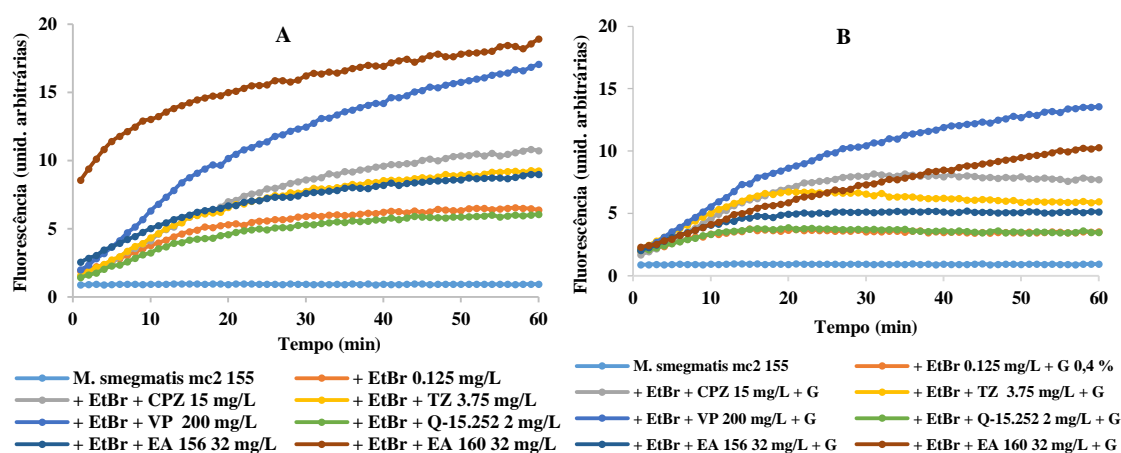


Figura 19. Ensaio de acumulação de EtBr [0,125mg/L] para a estirpe mc²155, na presença de inibidores de efluxo e dos novos compostos Q-15.252, EA156 e EA160 a ¼ da CMI, com ausência (A) e presença (B) de glucose 0,4%. CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil; G: glucose.

O composto EA160 foi aquele que promoveu maior acumulação de EtBr, quando comparado com os restantes compostos ou mesmo os controlos, na ausência de glucose (Figura 19.A). Na presença de glucose, apresentou um efeito inferior ao do verapamil, porém superior ao dos outros inibidores de efluxo e novos compostos (Figura 19.B). Relativamente ao composto EA156, este demonstrou algum efeito inibitório de efluxo, porém inferior ao dos controlos. Por sua vez, o composto Q-15.252 não apresentou qualquer efeito na acumulação do EtBr. Estes resultados são refletidos nos valores de RFF, apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Valores de RFF dos novos compostos e dos inibidores de efluxo e na ausência e presença de glucose 0,4 % para a estirpe mc²155. Os valores de RFF foram calculados com base na equação descrita nos Materiais e Métodos, 2.2.7.1.3.

IEs/ Novos compostos (¼ CMI)	RFF Sem glucose	RFF Com glucose
Q-15.252	-0,02 ± 0,05	0,06 ± 0,11
EA156	0,50 ± 0,10	1,00 ± 0,78
EA160	1,90 ± 0,10	3,37 ± 2,00
TZ	0,44 ± 0,01	1,09 ± 0,57
CPZ	0,69 ± 0,01	1,78 ± 0,85
VP	1,69 ± 0,02	3,54 ± 0,99

IE: inibidor de efluxo; RFF : “relative final fluorescence”; CMI: concentração mínima inibitória; EtBr: brometo de etídio; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil; G: glucose. Os valores de RFF apresentados correspondem à média ± desvio padrão de dois ensaios independentes.

Analisando os valores de RFF obtidos, confirma-se que o composto EA160 apresenta um efeito na acumulação do EtBr superior ao verapamil, sendo portanto um candidato a inibidor de efluxo. Por sua vez, o composto EA156 demonstra um fraco efeito na acumulação de EtBr, efeito esse inexistente para a composto Q-15.252. No entanto, como pode ser observado na Figura 19, o composto EA160 originou uma rápida acumulação de EtBr nos primeiros minutos do ensaio. Por essa razão, foram realizados ensaios adicionais, com diferentes concentrações deste composto para determinar se este efeito era dependente da concentração (Figura 20).

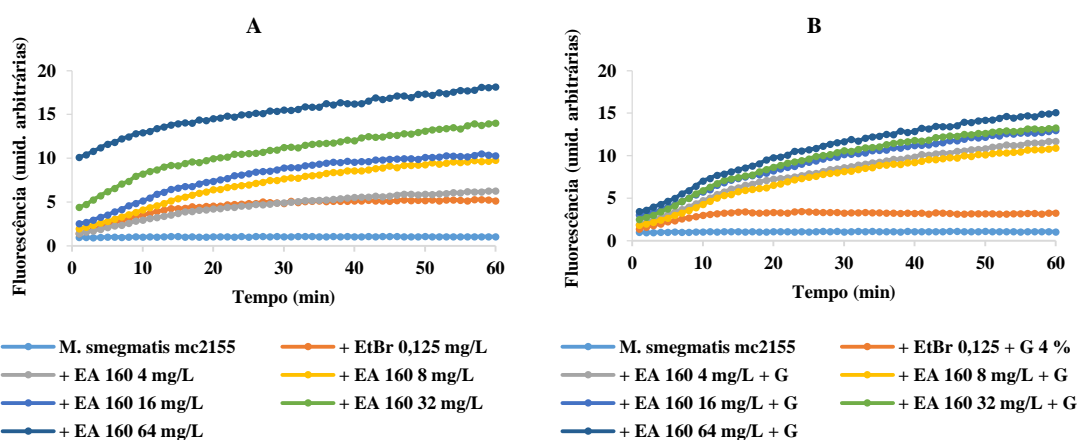


Figura 20. Ensaio de acumulação de EtBr [0,125mg/L] na presença do novo composto EA160 [4 – 64 mg/L] na ausência (A) e presença (B) de glucose 0,4% para a estirpe mc²155. EtBr: brometo de etídio; G: glucose.

Os valores de RFF correspondentes a estes ensaios encontram-se apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Valores de RFF do composto EA160 na ausência e presença de glucose 0,4 % para a estirpe mc²155.

[EA160]	RFF	
	Sem glucose	Com glucose
$\frac{1}{2}$ CMI*	$1,35 \pm 1,04$	$2,98 \pm 0,56$
$\frac{1}{4}$ CMI*	$1,11 \pm 0,72$	$2,25 \pm 0,70$
$\frac{1}{8}$ CMI*	$0,95 \pm 0,25$	$2,48 \pm 0,47$
$\frac{1}{16}$ CMI*	$1,13 \pm 0,21$	$1,79 \pm 0,48$
$\frac{1}{32}$ CMI*	$0,47 \pm 0,22$	$1,39 \pm 1,02$

IE: inibidor de efluxo; RFF : “relative final fluorescence”; CMI: concentração mínima inibitória; EtBr: brometo de etídio; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil; G: glucose.*Valor assumido tendo em conta que a CMI do novo composto é superior a 64 mg/L (maior concentração testada). Os valores de RFF correspondem à média \pm desvio padrão de quatro ensaios independentes.

Os dados apresentados na Figura 20 e na Tabela 23, demonstram que a atividade inibitória de efluxo do novo composto EA160 é dependente da sua concentração, apresentando um aumento de atividade à medida que concentração aumenta.

De acordo com o fluxograma (Figura 18), após os passos 2 e 3 é feita uma avaliação de cada composto. O composto Q-15.252, apresenta uma CMI inferior a 20 μ M, indicativa de atividade antimicobacteriana. Contudo, não possui atividade inibitória de efluxo nem atividade sinérgica significativa com agentes antimicrobianos. Sendo assim, apesar de Q-15.252 não ser um potencial adjuvante pode ser um potencial antimicrobiano, podendo o seu estudo em modelos de micobacterias patogénicas. Por outro lado, os compostos EA156 e EA160 demonstraram atividade inibitória de efluxo e deverão ser analisados de acordo com os **Passos 4 e 5**, para avaliação do seu potencial como inibidores de efluxo de EtBr e/ou atividade sinérgica significativa com agentes antimicrobianos. No entanto, devido a limitações na quantidade disponível dos dois compostos, estes somente foram analisados pelo **Passo 5**, ou seja, ensaios de efluxo.

3.8.4 Ensaios de efluxo

Foram realizados ensaios de efluxo (Figura 18, **Passo 5**) com o intuito de avaliar a atividade inibitória de efluxo dos compostos EA160 e EA156 a $\frac{1}{4}$ da CMI (Figura 21). À semelhança dos ensaios de acumulação, a clorpromazina, tioridazina e verapamil foram utilizados como controlos. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 21.

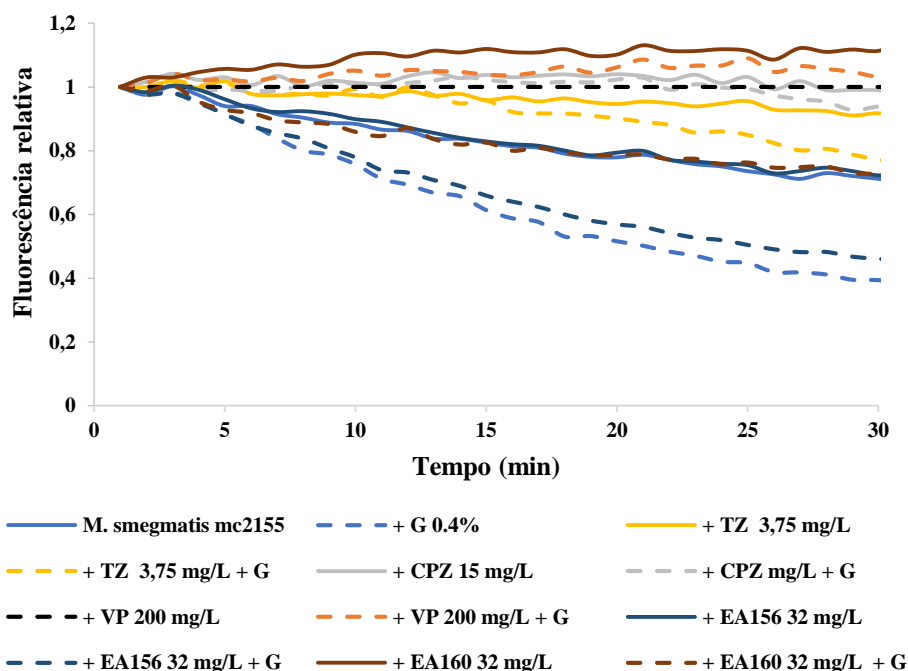


Figura 21. Ensaio de efluxo de EtBr [0,125 mg/L] na presença dos IEs e dos novos compostos EA156 e EA160 a $\frac{1}{4}$ da CMI (mg/L) na ausência e presença de glucose 0,4% para a estirpe mc²155. EtBr: brometo de etídio; CPZ: clorpromazina; TZ: tioridazina; VP: verapamil; G: glucose.

Ambos os compostos apresentaram atividade inibitória de efluxo, tendo o composto EA160 demonstrado maior atividade e o composto EA156 menor atividade. A capacidade significativa de inibição de efluxo do novo composto EA160 (superior ao verapamil), já observada nos ensaios de acumulação de EtBr, foi confirmada. Este último composto é portanto, um potencial inibidor de efluxo em *M. smegmatis*.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A resistência aos antibióticos é atualmente reconhecida como um problema de saúde pública global. Nos últimos anos, o número de casos associados a infecções causadas por estirpes bacterianas multirresistentes tem aumentado consideravelmente [88]. Em particular, 3,3 % dos novos casos de tuberculose notificados em 2014 foram devidos a estirpes multirresistentes (MDR-TB), 9,7 % dos quais evoluíram para tuberculose extensivamente resistente (XDR-TB) [88]. Nesta perspectiva, novas estratégias terapêuticas são necessárias para contornar o problema das infecções causadas por estirpes de *M. tuberculosis* multirresistentes.

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado a importância dos sistemas de efluxo na resistência aos antibióticos em micobactérias, conferindo resistência de baixo nível aos mesmos. O aumento da expressão de bombas de efluxo diminui os níveis intracelulares dos antibióticos, permitindo a sobrevivência de uma subpopulação micobacteriana. Pensa-se que esta condição favoreça a acumulação de mutações cromossômicas que culminará no desenvolvimento de um fenótipo de alto nível de resistência [76, 113].

Estas observações conduziram à sugestão de novas abordagens terapêuticas, baseadas na utilização combinada dos antibióticos existentes com moléculas que possuam atividade inibitória de efluxo. O trabalho desenvolvido nesta Dissertação teve como objetivo principal a construção e otimização de um modelo de rastreio e identificação de novos compostos com potencial atividade antimicobacteriana e/ou inibitória de efluxo em micobactérias. Para tal, utilizamos *M. smegmatis* como modelo micobacteriano e três moléculas já conhecidas. Este modelo foi de seguida testado com três novos compostos; o fenilimidazolo Q-15.252 e os tiazóisoxazolos EA156 e EA160.

4.1 Caracterização das estirpes *M. smegmatis* mc²155 e XZL1675

4.1.1 Análise do sistema de efluxo LfrA

O modelo construído baseia-se na utilização de estirpes de *M. smegmatis*, uma micobactéria de crescimento rápido e raramente patogénica. Esta espécie é frequentemente utilizada em estudos de rastreio de compostos com potencial antimicobacteriano e/ou inibidor de efluxo [49, 50, 53, 58, 59, 65, 93, 101, 114, 115, 129]. Neste modelo foram utilizadas duas estirpes isogénicas de *M. smegmatis*, a estirpe selvagem mc²155 e a estirpe mutante XZL1675 (mc²155 Δ *lfrA*). Estas duas estirpes diferem entre si na atividade da bomba de efluxo LfrA, que se encontra parcialmente deletada na estirpe XZL1675 [96]. No entanto, a extensão desta deleção não era conhecida à partida, pelo que o primeiro passo deste trabalho consistiu na caracterização do gene *lfrA* de modo a confirmar a inativação do sistema de efluxo LfrA na estirpe mutante.

O sistema de efluxo LfrA pertence à superfamília MFS e é composto por 14 segmentos transmembranares (Figura 22) [71].

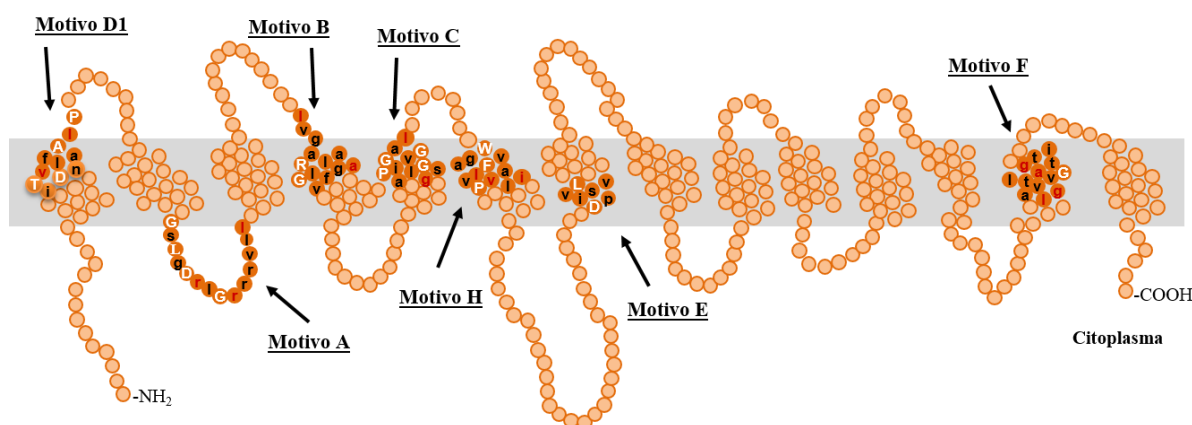


Figura 22. Estrutura bidimensional do sistema de efluxo LfrA em *M. smegmatis*. Os motivos conservados e respetivas sequências, característicos dos transportadores MFS de 14 segmentos transmembranares encontram-se destacados em círculos laranja escuro. Os aminoácidos que ocorrem frequentemente (> 70%) em transportadores MFS estão indicados a letra maiúscula branca, enquanto os aminoácidos que ocorrem em menor frequência (40-70%) estão indicados a letra minúscula (vermelha e preta). Os aminoácidos a preto indicam aqueles presentes somente em LfrA. Adaptado de [94].

No presente trabalho determinámos que na estirpe mutante XZL1675 o gene *lfrA* apresenta uma deleção de 576 nucleótidos, a que corresponde uma deleção de 192

aminoácidos que se estende do resíduo 72 ao resíduo 263 da proteína LfrA (ver Resultados, Figura 11). Várias sequências conservadas têm sido identificadas e associadas à estrutura e função nos transportadores MFS [117]. Em particular, os motivos conservados A e C têm sido associados a funções de transporte, nomeadamente, na bomba de efluxo MFS Tet(K) de *S. aureus* [46, 47]. A análise da sequência dos aminoácidos deletados na estirpe mutante XZL1675 indica que a deleção abarca resíduos que compreendem potencialmente os motivos conservados A, B, C, H e E (Figura 22), pelo que a bomba de efluxo LfrA da estirpe XZL1675, ainda que expressa, deverá corresponder a uma proteína não funcional.

4.1.2 Análise da expressão de genes codificantes para bombas de efluxo

Vários estudos têm demonstrado que a atividade de efluxo é essencial para o funcionamento das células bacterianas, observando-se que a inativação de um sistema de efluxo leva a que a célula responda com a sobreexpressão de sistemas de efluxo alternativos que possam compensar a atividade afetada [11, 138].

Para verificar se esta compensação ocorria também na estirpe mutante XZL1675, foi realizada uma análise comparativa da expressão de genes que codificam bombas de efluxo relativamente à estirpe selvagem mc²155. Para tal, foram pesquisadas possíveis bombas de efluxo em *M. smegmatis*, tendo em consideração as bombas presentes em *M. tuberculosis* com homologia em *M. smegmatis* (Tabela 24).

Tabela 24. Classificação e identidade de potenciais bombas de efluxo em *M. tuberculosis* H37Rv e respectivos homólogos em *M. smegmatis* mc²155.

Genes <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Genes <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	Família	Identidade dos resíduos de aminoácidos (%) ⁽¹⁾
Rv1258c (<i>tap</i>)	5128561 -5127888*	MFS	71
Rv3728	2700709- 2701012*	MFS	67
Rv2846c (<i>efpA</i>)	2700533-2701957*	MFS	78
Rv1410c (<i>p55</i>)	3143962-3142497*	MFS	73
Rv2136	4273222- 4274034*	MFS	72
Rv1634	3884079-3885303 *	MFS	71
Rv1877	3624193-3626023*	MFS	69
Rv2994	2463288-2464185*	MFS	68
Rv3239c	2700843-2700673*	MFS	70
Rv3728	2700709-2701012*	MFS	67
Rv2333c (<i>spt</i>)	1552103-1552049*	MFS	80
Rv2686c	1596891-1596163*	ABC	77
Rv2687c	1597725-1597012**	ABC	76
Rv2688c	1595426-1594565*	ABC	78
PstB	5851831-5852095***	ABC	68
DrrA	3194495-3194532*	ABC	89
Rv1348	6608987-6610697*	ABC	73
Rv1819c	3720790-3721485 *	ABC	75
Rv1747	1734251-1735723*	ABC	81
Rv0194	5752227-5752270*	ABC	86
Rv3679	6259101-6260137*	ATPase	75
<i>mmpL</i>	4778443-4778472*	RND	93
Rv0676c (<i>mmpL5</i>)	250195-252924 *	RND	75
Rv0342 (<i>iniA</i>)	783538-785132 *	Não identificado	73
Rv0343 (<i>iniC</i>)	786174-787639 *	Não identificado	75
Rv3806c	6471673-6472350 *	Proteína de membrana	78
Rv1002c	5533202 -5531794 *	Proteína de membrana	76
Ausente	<i>lfrA</i>	MFS	--

⁽¹⁾ Análise bioinformática (*M. tuberculosis* vs. *M. smegmatis*) realizada com o programa de alinhamento BLAST [79] com base no genoma de *M. smegmatis* disponível na base de dados GenBank (números de acesso: *CP009494.1, **CP001663.1, ***CP000480.1); -- não aplicável.

Das bombas de efluxo apresentadas na Tabela 24, foram selecionadas para o nosso estudo a P55, Tap e EfpA. Foi também analisada a bomba de efluxo LfrA e o seu repressor LfrR. Para tal, foram desenhados primers específicos para genes que as codificam e o nível de expressão de cada um comparado com o da estirpe selvagem.

As bombas P55, Tap e EfpA, correspondem a bombas MFS presentes em *M. tuberculosis* que têm sido muito estudadas e que apresentam homologia em *M. smegmatis* (identidade entre 71-78%). A escolha destes genes deve-se ao facto de partilharem com a LfrA o substrato EtBr, sendo portanto possíveis candidatas a compensar a função perdida pela deleção parcial de LfrA na estirpe mutante [1, 14, 45, 69]. No entanto, não se detetou sobreexpressão dos três sistemas de efluxo alternativos analisados na estirpe XZL1675. Esta observação pode dever-se ao facto de (i) a expressão dos genes em estudo ter sido quantificada em condições normais de crescimento bacteriano, sem exposição prévia ao substrato EtBr, podendo não ter ocorrido indução da expressão de sistemas de efluxo alternativos à LfrA; (ii) a possível utilização por parte da bactéria de outra(s) bomba(s) de efluxo que não foram estudadas e que também tenham o EtBr como substrato, tais como DrrA, Rv2333c e Rv0194 (Tabela 24). Também não se verificou sobreexpressão do gene *lfrA* alterado ou de *lfrR* na estirpe mutante XZL1675. Vários estudos têm associado as bombas de efluxo ao transporte de compostos que não são agentes antimicrobianos, como metabolitos secundários, sideróforos, toxinas, entre outros; mostrando que as bombas de efluxo associadas a multirresistência podem estar envolvidas noutras funções celulares [98, 105]. A sobrevivência da estirpe XZL1675 na ausência de uma LfrA funcional pode indicar que a bomba de efluxo LfrA não participa ou não é essencial para o funcionamento de *M. smegmatis* em condições normais de crescimento.

4.1.3 Perfil de suscetibilidade das estirpes

O perfil de suscetibilidade das duas estirpes de *M. smegmatis* foi determinado para antibióticos relevantes e para o marcador de efluxo EtBr. Como referido anteriormente, as duas estirpes em estudo diferem entre si na atividade da bomba de efluxo LfrA, que apresenta como substratos o EtBr, a rifampicina, as fluoroquinolonas e o etambutol [69, 71, 111, 119]. Como esperado, a estirpe mutante XZL1675 (mc²155 Δ *lfrA*) evidenciou maior suscetibilidade ao EtBr, às fluoroquinolonas ofloxacina e ciprofloxacina, à

rifampicina e ao etambutol, quando comparada com a estirpe selvagem mc²155. Estes resultados corroboram estudos anteriores que demonstraram maior suscetibilidade da XZL1675 a estes compostos, indicando que a LfrA poderá contribuir para a resistência intrínseca a estes agentes antimicrobianos em *M. smegmatis* [69, 111]. Entre estes, o EtBr mostrou ser um bom substrato da LfrA, apresentando uma redução da CMI de 16 vezes para a estirpe mutante. A estirpe mutante evidencia também maior suscetibilidade aos inibidores de efluxo testados, confirmando observações anteriores [111].

4.1.4 Avaliação do efeito dos inibidores de efluxo sobre o valor de CMIs dos antibióticos e EtBr

Vários estudos têm evidenciado a capacidade dos inibidores de efluxo clorpromazina, tioridazina e verapamil para reduzir as CMIs de vários antibióticos em micobactérias [8, 25, 68, 76, 106, 110, 111, 112, 113] e noutras espécies bacterianas [30, 78].

Tal como observado nesses estudos, na estirpe selvagem mc²155 estes inibidores de efluxo promoveram, de modo geral, uma redução das CMIs quer de substratos de LfrA (EtBr, fluoroquinolonas e rifampicina), quer de outros antibióticos (macrólidos) que são substratos de outros sistemas de efluxo, por exemplo, Mmr e DrrAB (Tabela 2). Este resultado indica que estes inibidores de efluxo possuem uma ação geral nos sistemas de efluxo de *M. smegmatis*. Este efeito foi menos significativo na estirpe mutante XZL1675, o que pode ser devido à atividade de efluxo nesta estirpe ser, já por si, mais reduzida. Neste trabalho, observou-se um efeito antagónico destes inibidores de efluxo na CMI do etambutol, ao contrário do registado em outros estudos [110, 111], o que deverá ser objeto de estudo mais aprofundado no futuro.

4.2 Construção e otimização do modelo de rastreio

Construção dos ensaios de rastreio

O desenvolvimento do modelo experimental proposto nesta Dissertação procura dar resposta a um problema sentido no nosso laboratório, em que somos frequentemente solicitados a testar novos compostos com potencial interesse em micobactérias ou outras bactérias patogénicas. Geralmente, os compostos recebidos são sintetizados com determinado propósito, isto é, por exemplo como potenciais inibidores de efluxo. Na experiência do Grupo de Micobactérias do IHMT/UNL, e tendo já trabalhado com várias coleções de compostos, esta diferenciação funcional pré-estabelecida, nem sempre se reflete nos resultados obtidos, levando muitas vezes, a uma confusão entre potencial efeito antimicrobiano, potencial efeito adjuvante e potencial efeito de inibidor de efluxo. Sendo três características distintas, elas confundem-se em alguns aspetos, nomeadamente, um composto pode evidenciar bom efeito adjuvante com outros antimicrobianos por inibição de sistemas de efluxo ou por outro mecanismo não relacionado. O modelo metodológico desenvolvido tenta clarificar este problema, propondo uma abordagem experimental em que os diferentes efeitos de um mesmo composto são avaliados em etapas sucessivas e não exclusivas. Pretende-se assim retirar o máximo de informação funcional para cada nova molécula, procurando otimizar os vários recursos envolvidos neste tipo de avaliação (tempo, custo e quantidade de composto disponível).

Para a construção do modelo foi necessário estabelecer valores de corte para classificar os compostos nas diferentes categorias estabelecidas (antimicobacteriano, adjuvante via inibição de efluxo, adjuvante por outro mecanismo e composto sem interesse biológico). Os valores de corte considerados, nomeadamente CMI, fator de redução de CMI, RFF e FIC englobam valores já descritos na literatura e valores arbitrariamente definidos neste trabalho. O primeiro valor de corte a ser considerado remete a um valor de CMI igual ou inferior a 20 μM [99], indicativo da presença de atividade antimicobacteriana numa dada molécula. Uma particularidade do modelo é ter em consideração valores de RFF acima de 1 e a redução da CMI de brometo de etídeo para, pelo menos, um quarto do seu valor original, como únicos critérios para individualizar possíveis adjuvantes por inibição de efluxo. Todavia, a aplicação do

modelo a um maior número de compostos deverá permitir uma melhor definição do limite inferior de RFF. Compostos, que apesar de apresentarem valores de RFF abaixo de 1, possuam a capacidade de reduzir a CMI de antibióticos serão considerados como potenciais adjuvantes por um mecanismo que não inibição de efluxo. Deste modo, os **Passos 1 a 3** (Figura 18), permitem identificar possíveis compostos antimicobacterianos ou adjuvantes, assim como rejeitar compostos que, à partida, não terão efeito significativo.

A aplicação destes primeiros passos com os compostos clorpromazina, tioridazina e verapamil permitiu classificá-los como adjuvantes, já que todos apresentam valores de CMI acima de 20 µM e distinguir o verapamil como inibidor de efluxo, uma vez que reduziu consideravelmente a CMI do EtBr, com valores de RFF superiores a 1. De qualquer modo, as fenotiazinas evidenciaram também, diminuição da CMI do EtBr, o que aliado à sua já conhecida atividade inibitória de efluxo, evidencia a necessidade de haver alguma flexibilidade na aplicação dos critérios definidos.

Ensaio de sinergismo

A avaliação do efeito dos inibidores de efluxo clorpromazina, tioridazina e verapamil nas CMIs dos antibióticos e EtBr pelo método de “checkerboard” demonstrou uma interação sinérgica significativa com os macrólidos eritromicina e claritromicina e com o EtBr. Para os antibióticos rifampicina e estreptomicina observou-se um efeito sinérgico, mas apenas a concentrações mais elevadas ($\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ CMI). Entre os três inibidores de efluxo testados, o verapamil foi o que demonstrou maior efeito sinérgico, corroborando dados obtidos em *M. tuberculosis* [25, 101]. À semelhança dos ensaios anteriores, este efeito sinérgico foi menos pronunciado para a estirpe mutante, devido à sua menor atividade de efluxo. No entanto, observa-se ainda algum efeito sinérgico dos inibidores de efluxo com o EtBr, sugerindo a presença de atividade de efluxo residual nesta estirpe, que deverá ser assumida por outros sistemas de efluxo.

Avaliação da atividade de efluxo

O sistema de efluxo LfrA, tendo como substrato o fluorocromo EtBr, constitui um alvo “útil” para a avaliação da atividade de efluxo em *M. smegmatis* [69, 90, 128, 139, 140].

Uma vez que o sistema de efluxo LfrA se encontra inativado na estirpe XZL1675, seria expectável observar um aumento da acumulação de EtBr por esta estirpe, já reportado por Rodrigues *et al.* [111]. Ao invés, a estirpe mutante apresentou um perfil de acumulação de EtBr semelhante ao da estirpe selvagem. Todavia, a uma concentração de 1 mg/L de EtBr, a acumulação de EtBr na estirpe mutante foi superior à da estirpe selvagem (Figura 15). Esta concentração de EtBr corresponde a um valor acima da CMI para a estirpe XZL1675 (CMI = 0,5 mg/L), o que poderá ter influenciado o perfil de acumulação da estirpe devido a um possível efeito antimicrobiano do EtBr. Não obstante, estes resultados podem indicar que a estirpe mutante pode estar a efluxar EtBr por outra(s) bomba(s) de efluxo. Esta hipótese é suportada pela ocorrência de sinergismo entre inibidores de efluxo e EtBr na estirpe mutante. Para além disso, nos ensaios de fluorometria as estirpes estão expostas ao substrato EtBr, contrariamente aos ensaios de RT-qPCR. Nestas condições, a estirpe mutante poderá ter recorrido a outras bombas de efluxo para compensar a inativação do sistema de efluxo LfrA.

Nestes ensaios, foi também possível detetar a dependência energética dos sistemas de efluxo, com o registo de menor acumulação de EtBr na presença de uma fonte de energia (glucose). Esta observação está de acordo com os requisitos energéticos da maioria dos sistemas de efluxo, dependentes do gradiente eletroquímico protónico ou da hidrólise do ATP para efetuar o transporte dos seus substratos.

Seguidamente, foi estudada a acumulação de EtBr na presença dos três inibidores de efluxo, clorpromazina, tioridazina e verapamil. As fenotiazinas clorpromazina e tioridazina inibem o transporte de potássio do ambiente extracelular para o interior da célula, assim como o transporte do cálcio, através da inibição da ligação do cálcio às proteínas transportadoras [4, 5]. Deste modo, há uma inibição das enzimas dependentes de cálcio, tais como as ATPases, que hidrolisam o ATP libertando energia que é utilizada pelos sistemas de efluxo [89]. Deste modo, há assim uma inativação dos sistemas de efluxo que possuem uma dependência energética destas ATPases [4, 5]. Estudos mais

recentes sugerem que estas moléculas poderão atuar ao nível da NADH menaquinona desidrogenase do tipo II (NDH-2), uma enzima essencial na cadeia respiratória das micobactérias [109, 143]. Por sua vez, a fenilalquilamina verapamil inibe os canais de cálcio e consequentemente a redução do potencial de membrana e dos níveis intracelulares de ATP, que culmina com a inibição dos sistemas de efluxo [7, 91].

Todos os inibidores testados contribuíram para a acumulação de EtBr, embora o verapamil tenha sido o mais eficaz. Este efeito inibitório ocorre nas duas estirpes, sugerindo uma ação global nos sistemas de efluxo da célula e corroborando estudos anteriores [90, 110, 111, 139].

Os resultados obtidos nos ensaios de efluxo confirmaram os anteriormente observados, com uma inibição significativa do efluxo de EtBr na presença destes compostos. Foi possível constatar uma redução significativa da atividade de efluxo da estirpe mutante, estando estes resultados em concordância com estudos anteriores [111].

Contudo, é de realçar que a molaridade dos compostos testados é distinta (ver Resultados, Tabela 13). O verapamil mostrou ser o mais potente dos inibidores de efluxo testados, porém a uma concentração molar aproximadamente 3-5 vezes superior às concentrações de clorpromazina e de tioridazina, respetivamente. A uma concentração molar similar ao verapamil, ambas as fenotiazinas poderão apresentar um efeito semelhante ou superior ao mesmo. No entanto, essa concentração poderá apresentar uma toxicidade elevada para as células bacterianas e o seu efeito dever-se não à inibição de efluxo em si, mas à atividade antibacteriana.

4.3 Aplicação do modelo na avaliação de novos compostos

O segundo objetivo deste trabalho foi a identificação de novos compostos com potencial atividade antimicobacteriana e/ou inibitória de efluxo. Para isso, estudaram-se compostos desenhados por um grupo colaborador; o composto Q-15.252, um fenilimidazolo, desenhado como bloqueador de canais de cálcio [100] e dois tiazóisoxazolos, EA156 e EA160.

O composto Q-15.252 apresentou uma CMI de 8 mg/L (19,5 µM) indicando possuir alguma atividade antimicobacteriana. Os compostos EA156 e EA160 apresentaram CMIs

acima de 64 mg/L (166,6 μ M e 130,8 μ M, respectivamente), valores assumidos como indicativos de ausência de atividade antimicobacteriana [99, 101].

Posteriormente, foi avaliada a atividade do composto Q-15.252 nas CMI's de antibióticos e EtBr a diferentes concentrações verificando-se que o composto Q-15.252 não possui atividade sinérgica com antibióticos ou EtBr.

De seguida, procedeu-se à realização de ensaios de acumulação de EtBr na presença dos três novos compostos. Nestes, foi observada uma capacidade significativa do composto EA160 em promover acumulação de EtBr na estirpe mc²155. Por sua vez, o composto EA156 demonstrou ter menor efeito na acumulação de EtBr, apresentando um efeito semelhante à tioridazina, enquanto o composto Q-15.252 não apresentou qualquer efeito. A potencial atividade inibitória de efluxo dos compostos EA160 e EA156 foi confirmada por ensaios de efluxo. É de destacar que nestes ensaios, o composto EA160 apresenta uma atividade inibitória de efluxo superior à do composto de referência verapamil.

Porém, como já referido, tanto os inibidores de efluxo como os compostos apresentam molaridades distintas (ver Resultados, Tabelas 13 e 20). Analisando os resultados em molaridades, os compostos EA156 e EA160 apresentaram atividade inibitória de efluxo a uma concentração de 65,4 μ M e 83,3 μ M, respectivamente. Por outro lado, o composto Q-15.252 não apresentou qualquer atividade a uma concentração de 4,9 μ M. Embora a molaridades superiores, semelhantes às dos compostos EA156 e EA160, o Q-15.252 pudesse promover acumulação de EtBr, esse efeito não seria detetado uma vez que essa concentração seria tóxica para as células micobacterianas. Por sua vez, o composto EA160, apresentou uma atividade inibitória de efluxo superior à do verapamil, embora a uma concentração cinco vezes inferior ao mesmo, sendo necessário um menor número de moléculas para se obter efeitos equivalentes. Este resultado salienta o potencial deste composto e a importância de prosseguir a sua caracterização.

É ainda de salientar que o composto Q-15.252, apesar de não ser um potencial adjuvante, demonstrou alguma atividade antimicobacteriana, pelo que poderá servir de molécula de referência para a síntese de derivados com atividade antimicobacteriana melhorada.

O modelo desenvolvido nesta Dissertação para rastreio e identificação de compostos com atividade antimicobacteriana e/ou inibitória de efluxo mostrou ser eficaz, apresentando as seguintes vantagens: (i) assenta numa metodologia simples e barata, quando comparada, por exemplo, com a determinação de CMI para *M. tuberculosis*; (ii) providencia uma abordagem mais segura/simples em termos de biossegurança (modelo de micobactéria não patogénica); (iii) os resultados obtidos com os compostos de referência foram os esperados, o que substantia a sua aplicação à avaliação de novos compostos; (iv) permite analisar rapidamente e em simultâneo um número significativo de diferentes compostos, utilizando quantidades mínimas de cada (à exceção dos ensaios de sinergismo, mais exigentes na quantidade de composto a disponibilizar); (v) permite uma avaliação prévia da atividade de compostos, antecipando aqueles para os quais valerá a pena utilizar (sintetizar ou isolar) quantidades maiores para efetuar ensaios adicionais (ensaios de sinergismo, ensaios de efluxo), e mais importante, testar em micobactérias patogénicas.

Contudo, este modelo experimental também apresenta algumas limitações, nomeadamente a transposição para modelos mais complexos do ponto de vista de biossegurança (*M. tuberculosis*) pode não ser direta, devido a diferenças nos sistemas de efluxo e/ou outras características próprias de cada espécie micobacteriana. Em particular, embora o sistema de efluxo LfrA seja um bom modelo de estudo da atividade de efluxo, este não possui um homólogo em *M. tuberculosis*. No entanto, vários outros sistemas de efluxo MFS estão presentes em *M. tuberculosis* (Tabelas 2 e 24) e partilham o EtBr como substrato, o que à partida permitirá a transposição dos resultados obtidos para *M. tuberculosis*.

A aplicação deste modelo metodológico a compostos de referência permitiu confirmar o verapamil como um potente adjuvante que atua por inibição de efluxo. As fenotiazinas, clorpromazina e tioridazina demonstraram uma fraca atividade inibitória de efluxo e antimicobacteriana, sendo no entanto potenciais adjuvantes. O modelo foi aplicado a três novos compostos, Q-15.252, EA156 e EA160, permitindo identificar o tiazóisoxazolo EA160 como potencial novo inibidor de efluxo em micobactérias. No entanto, a avaliação da atividade deste composto foi limitada pela quantidade reduzida de composto disponível à determinação da sua CMI e ensaios de acumulação/efluxo de EtBr

(**Passos 1, 3 e 5** do modelo experimental). Deste modo, o trabalho desenvolvido nesta Dissertação deverá ser continuado, o que envolverá a produção de maiores quantidades deste composto pelo grupo colaborador da Università degli studi di Parma e avaliação da sua capacidade para reduzir CMI de antibióticos e EtBr (**Passo 2** do modelo experimental) e em ensaios de sinergismo (**Passo 4** do modelo experimental). Caso se confirme a atividade inibitória de efluxo deste composto, deverá então ser testado em *M. tuberculosis*. Embora não tão promissores, os resultados obtidos para o tiazóisoxazolo EA156 poderão dar também pistas importantes para a importância funcional da sua estrutura e em conjunto com os resultados de EA160, guiar o grupo colaborador no desenho de compostos com melhor atividade inibitória de efluxo.

Um outro aspeto dos estudos efetuados que poderá ser explorado em trabalhos futuros é a utilização de estirpes isogénicas que diferem na atividade de uma única bomba de efluxo. À partida, esta será uma abordagem eficaz para avaliar o papel desempenhado por essa bomba na extrusão de um composto ou gama de compostos, assim como para avaliar compostos que inibam a sua função. No entanto, os nossos resultados demonstraram que tal abordagem necessita de um aperfeiçoamento dos parâmetros experimentais para se conseguir isolar esse efeito, já que a célula tende a compensar a perda de funcionalidade de uma bomba em particular com a ativação de outros sistemas de efluxo, sendo que a identificação de qual(is) o(s) sistema(s) de efluxo compensatórios poderá estar dependente das condições utilizadas.

O modelo desenvolvido nesta Dissertação classifica novos compostos, sintetizados ou isolados da Natureza, em duas categorias, em termos de atividade: (i) possíveis compostos antimicobacterianos, capazes de por si só, em concentrações suficientemente baixas, eliminarem micobactérias; (ii) compostos adjuvantes, isto é, que por si só não exibem atividade antimicobacteriana significativa, mas que em conjunto com outros compostos, os tornam mais eficaz na sua ação antimicobacteriana. Dentro deste segundo grupo, distinguimos ainda aqueles cuja ação adjuvante se dá pela inibição da atividade de efluxo. Este raciocínio poderá servir para delinear novas abordagens no desenho e/ou aperfeiçoamento de moléculas que exibam algum potencial num destes aspetos.

Embora este modelo tenha sido desenvolvido para avaliação de compostos com possível atividade contra micobactérias, os conceitos que lhe serviram de base são

comuns à maioria das bactérias, o que significa que pode ser aplicado a outros microrganismos com interesse, do ponto de vista de clínica humana, veterinária ou de aplicação industrial, entre outros, pelo que se espera que venha a ser testado noutros modelos bacterianos. Exemplo disso é a aplicação deste modelo para teste de inibidores efluxo já iniciada em *Staphylococcus aureus*, com resultados igualmente promissores.

5 Referências bibliográficas

- [1] **Aínsa, J. A., M. C. Blokpoel, I. Otal, D. B. Young, K. A. De Smet, and C. Martín.** 1998. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **180**:5836–5843.
- [2] **Aksamit, T. R., J. V. Philley, and D. E. Griffith.** 2014. Nontuberculous mycobacterial (NTM) lung disease: the top ten essentials. *Respir. Med.* **108**:417–425.
- [3] **Amaral, L., J. E. Kristiansen, M. Viveiros, and J. Atouguia.** 2001. Activity of phenothiazines against antibiotic-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a review supporting further studies that may elucidate the potential use of thioridazine as anti-tuberculosis therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:505–511.
- [4] **Amaral, L., M. Viveiros, and J. Molnar.** 2004. Antimicrobial activity of phenothiazines. *In Vivo.* **18**:725–732.
- [5] **Amaral, L., M. Martins, and M. Viveiros.** 2007. Enhanced killing of intracellular multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by compounds that affect the activity of efflux pumps. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:1237–1246.
- [6] **Amaral, L., and M. Viveiros.** 2012. Why thioridazine in combination with antibiotics cures extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **39**:376–380.
- [7] **Andersen, C. L., I. B. Holland, and A. Jacq.** 2006. Verapamil, a Ca²⁺ channel inhibitor acts as a local anesthetic and induces the sigma E dependent extra-cytoplasmic stress response in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**:1587–1595.
- [8] **Balganesh, M., S. Kuruppath, N. Marcel, S. Sharma, A. Nair, and U. Sharma.** 2010. Rv1218c, an ABC transporter of *Mycobacterium tuberculosis* with implications in drug discovery. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5167–5172.
- [9] **Barrera, L.** 2007. The basics of clinical bacteriology. p. 93-112 *In* J. C. Palomino, S. C. Leão and V. Ritacco (ed.), *Tuberculosis 2007- from basic science to patient care*. 1^a ed. Disponível em www.tuberculosis-textbook.com.

- [10] **Bay, D. C., K. L. Rommens, and R. J. Turner.** 2008. Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**:1814–1838.
- [11] **Bazzini, S., C. Udine, A. Sass, M. R. Pasca, F. Longo, G. Emiliani, M. Fondi, E. Perrin, F. Decorosi, C. Viti, L. Giovannetti, L. Leoni, R. Fani, G. Riccardi, E. Mahenthiralingam, and S. Buroni.** 2011. Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*. *PLoS One.* **6**:e18902. doi: 10.1371.
- [12] **Bellinzoni, M., S. Buroni, F. Schaeffer, G. Riccardi, E. De Rossi, and P. M. Alzari.** 2009. Structural plasticity and distinct drug-binding modes of LfrR, a mycobacterial efflux pump regulator. *J. Bacteriol.* **191**:7531–7537.
- [13] **Bhatt, K., S. K. Banerjee, and P. K Chakraborti.** 2000. Evidence that phosphate specific transporter is amplified in a fluoroquinolone resistant *Mycobacterium smegmatis*. *Eur. J. Biochem.* **267**:4028–4032.
- [14] **Bianco, M. V, F. C. Blanco, B. Imperiale, M. A. Forrellad, R. V. Rocha, L. I. Klepp, A. A. Cataldi, N. Morcillo, and F. Bigi.** 2011. Role of P27-P55 operon from *Mycobacterium tuberculosis* in the resistance to toxic compounds. *BMC Infect. Dis.* **11**:195. doi: 10.1186/1471-2334-11-195.
- [15] **Biet, F., M. L. Boschioli, M. F. Thorel, and L. A. Guilloteau.** 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). *Vet. Res.* **36**:411–436.
- [16] **Blair, J. M., M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, and L. J. Piddock.** 2014. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**:42–51.
- [17] **Braibant, M., P. Gilot, and J. Content.** 2000. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:449–467.
- [18] **Brown-Elliott B. A., and R. J. Wallace Jr.** 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:716–746.

- [19] **Buroni, S., G. Manina, P. Gugliera, M. R. Pasca, G. Riccardi, and E. De Rossi.** 2006. LfrR is a repressor that regulates expression of the efflux pump LfrA in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:4044–4052.
- [20] **Cáceres, N. E., N. B. Harris, J. F. Wellehan, Z. Feng, V. Kapur, and R. G. Barletta.** 1997. Overexpression of the D-alanine racemase gene confers resistance to D-cycloserine in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **179**:5046–5055.
- [21] **Campbell, P. J., G. P. Morlock, R. D. Sikes, T. L. Dalton, B. Metchock, A. M. Starks, D. P. Hooks, L. S. Cowan, B. B. Plikaytis, and J. E. Posey.** 2011. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:2032–2041.
- [22] **Cassidy P. M., K. Hedberg, A. Saulson, E. McNelly, and K. L. Winthrop.** 2009. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin. Infect. Dis.* **49**:e124–129.
- [23] **Choudhuri, B. S., S. Bhakta, R. Barik, J. Basu, M. Kundu, and P. Chakrabarti.** 2002. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **285**:279–285.
- [24] **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae and other aerobic Actinomycetes. CLSI M24-A2. Wayne, PA, USA.
- [25] **Coelho, T., D. Machado, I. Couto, R. Maschmann, D. Ramos, A. von Groll, M. L. Rossetti, P. A. Silva, and M. Viveiros.** 2015. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. *Front. Microbiol.* **6**:330. doi: 10.3389.
- [26] **Colangeli, R., D. Helb, S. Sridharan, J. Sun, M. Varma-Basil, M. H. Hazbón, R. Harbacheuski, N. J. Megjugorac, W. R. Jacobs Jr., A. Holzenburg, J. C. Sacchettini, and D. Alland.** 2005. The *Mycobacterium*

tuberculosis iniA gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol. Microbiol.* **55**:1829–1840.

- [27] **Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M.-A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**:537–544.
- [28] **Corti M., and Palmero D.** 2008. *Mycobacterium avium* complex infection in HIV/AIDS patients. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **6**:351–363.
- [29] **Couderc, C., A. Carbonne, J. M. Thiolet, F. Brossier, A. Savey, C. Bernet, C. Ortmans, C. Lecadet-Morin, I. Coudière, M. Aggoune, P. Astagneau, B. Coignard, and E. Cambau.** 2011. Infections à mycobactéries atypiques liées à des soins esthétiques en France, 2001–2010. *Med. Mal. Infect.* **41**:379–383.
- [30] **Couto, I., S. S. Costa, M. Viveiros, M. Martins, and L. Amaral.** 2008. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**:504–513.
- [31] **Da Silva, P. A., and J. A. Aínsa.** 2007. Drugs and Drug Interactions. p. 593-633. *In* J. C. Palomino, S. C. Leão and V. Ritacco (ed.), *Tuberculosis 2007 - from basic science to patient care.* 1^a ed. Disponível em: www.tuberculosisistextbook.com.
- [32] **Da Silva, P. E., A. Von Groll, A. Martin, and J. C. Palomino.** 2011. Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**:1-9.
- [33] **Danilchanka, O., C. Mailaender, and M. Niederweis.** 2008. Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2503–2511.

- [34] **De Rossi, E., M. Branzoni, R. Cantoni, A. Milano, G. Riccardi, and O. Ciferri.** 1998a. *mmr*, a *Mycobacterium tuberculosis* gene conferring resistance to small cationic dyes and inhibitors. *J. Bacteriol.* **180**:6068–6071.
- [35] **De Rossi, E., M. C. Blokpoel, R. Cantoni, M. Branzoni, G. Riccardi, D. B. Young, K. A. De Smet, and O. Ciferri.** 1998b. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, *tet(V)*, from *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:1931–1937.
- [36] **De Rossi, E., P. Arrigo, M. Bellinzoni, P. A. Silva, C. Martín, J. A. Aínsa, and P. Guglierame, and Riccardi G.** 2002. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Med.* **8**:714-724.
- [37] **De Rossi, E., J. A. Aínsa, and G. Riccardi.** 2006. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: An unresolved question. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:36–52.
- [38] **Doran, J. L., Y. Pang, K. E. Mdluli, A. J. Moran, T. C. Victor, R. W. Stokes, E. Mahenthiralingam, B. N. Kreiswirth, J. L. Butt, G. S. Baron, J. D. Treit, V. J. Kerr, P. D. Van Helden, M. C. Roberts, and F. E. Nano.** 1997. *Mycobacterium tuberculosis* *efpA* encodes an efflux protein of the QacA transporter family. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**:23–32.
- [39] **Dorman, S. E., and R. E. Chaisson.** 2007. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nature Med.* **13**:295–298.
- [40] **Eaves, D. J., V. Ricci, and L. J. Piddock.** 2004. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: role in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1145–1150.
- [41] **El Chaer F., N. Harris, H. El Sahly, V. Hemmige, E. M. Blanco, and L. Woc-Colburn.** 2015. *Mycobacterium avium* complex-associated cholecystitis in AIDS patient: a case description and review of literature. *Int. J. STD. AIDS.* pii: 0956462415588445.

- [42] **Eliopoulos, G. M., and R. C. Moellering Jr.** 1996. Antimicrobial combinations, p. 330–396. *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 4^a Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
- [43] **Escribano, I., J. C. Rodríguez, B. Llorca, E. García-Pachon, M. Ruiz, and G. Royo.** 2007. Importance of the efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to fluoroquinolones and linezolid. *Chemother.* **53**:397–401.
- [44] **Euzéby, J. P.** 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:590-592. (www.bacterio.net, última atualização a 9 de Julho de 2015, acessado em 13 de Outubro de 2015).
- [45] **Farrow M. F. and E. J. Rubin.** 2008. Function of a mycobacterial major facilitator superfamily pump requires a membrane-associated lipoprotein. *J. Bacteriol.* **190**:1783–1791.
- [46] **Fujihira, E., T. Kimura, and A. Yamaguchi.** 1997. Roles of acidic residues in the hydrophilic loop regions of metal-tetracycline/H⁺ antiporter Tet(K) of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett.* **419**:211-214.
- [47] **Ginn, S. L., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2000. The TetA(K) Tetracycline/H⁺ antiporter from *Staphylococcus aureus*: mutagenesis and functional analysis of motif C. *J. Bacteriol.* **182**:1492–1498.
- [48] **Griffith, D. E., T. Aksomit, B. A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S. M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt, M. F. Iademarco, M. Iseman, K. Olivier, S. Ruoss, C. F. von Reyn, R. J. Wallace Jr., and K. Winthrop.** 2007. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**:367–416.
- [49] **Gröblacher, B., O. Kunert, and F. Bucar.** 2012. Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorg. Med. Chem.* **20**:2701–2706.

- [50] **Gröblacher, B., V. Maier, O. Kunert, and F. J. Bucar.** 2012. Putative mycobacterial efflux inhibitors from the seeds of *Aframomum melegueta*. *J. Nat. Prod.* **75**:1393–1399.
- [51] **Grosset, J.** 2003. *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:833–836.
- [52] **Gupta, S., S. Tyagi, D. V. Almeida, M. C. Maiga, N. C. Ammerman, and W. R. Bishai.** 2013. Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with verapamil as an efflux inhibitor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**:600–607.
- [53] **Jackson, C. J., D. C. Lamb, D. E. Kelly, and S. L. Kelly.** 2000. Bactericidal and inhibitory effects of azole antifungal compounds on *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **19**:159–162.
- [54] **Jarlier, V., and H. Nikaido.** 1994. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**:11–18.
- [55] **Jarzembowski, J. A., and M. B. Young.** 2008. Nontuberculous mycobacterial infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **132**:1333–1341.
- [56] **Jellen-Ritter, A. S., and W. V. Kern.** 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1467–1472.
- [57] **Jiang X, W. Zhang, Y. Zhang, F. Gao, C. Lu, X. Zhang, and H. Wang.** 2008. Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR. *Microb. Drug Resist.* **14**:7–11.
- [58] **Jin, J., J. Y. Zhang, N. Guo, H. Sheng, L. Li, J. C. Liang, X. L. Wang, Y. Li, M. Y. Liu, X. P. Wu, and L. Yu.** 2010. Farnesol, a potential efflux pump inhibitor in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecules.* **15**:7750–7762.
- [59] **Jin, J., J. Zhang, N. Guo, H. Feng, L. Li, J. Liang, K. Sun, X. Wu, X. Wang, M. Liu, X. Deng, and L. J. Yu.** 2011. The plant alkaloid piperine as a

potential inhibitor of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium smegmatis*. J. Med. Microbiol. **60**:223–229.

- [60] **Kaatz, G. W., V. V. Moudgal, S. M. Seo, and J. E. Kristiansen.** 2003. Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:719–726.
- [61] **Kishore, K. K., G. S. H. Ramakanth, N. Chandrasekhar, P. V. Kishan, C. U. Kumar, and P. Usharani.** 2014. Thioridazine: a potential adjuvant in pharmacotherapy of drug resistant tuberculosis. Int. J. Basic Clin. Pharmacol. **3**:928–932.
- [62] **Koressaar, T., and M. Remm.** 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. Bioinformatics. **23**:1289–1291.
- [63] **Kuroda, T., and T. Tsuchiya.** 2009. Multidrug efflux transporters in the MATE family. Biochim. Biophys. Acta. **1794**:763–768.
- [64] **Leão, S. C., A. Martin, G. I. Mejia, J. C. Palomino, J. Robledo, M. A. S. Telles, and F. Portaels.** 2004. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Vanden BROELLE. Brugges.
- [65] **Lechner, D., S. Gibbons, and F. Bucar.** 2008. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. J. Antimicrob. Chemother. **62**:345–348.
- [66] **Lee, R. W., M. N. Huda, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** 2003. EfrAB, an ABC multidrug efflux in pump in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. **47**:3733–3738.
- [67] **Li, G., J. Zhang, Q. Guo, J. Wei, Y. Jiang, X. Zhao, L. L. Zhao, Z. Liu, J. Lu, and K. Wan.** 2015a. Study of efflux pump gene expression in rifampicin-monoresistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. J. Antibiotics. **68**:431–435.
- [68] **Li, G., J. Zhang, Q. Guo, Y. Jiang, J. Wei, L. L. Zhao, X. Zhao, J. Lu, and K. Wan.** 2015b. Efflux pump gene expression in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. PLoS One. **10**:e0119013. doi: 10.1371.

- [69] **Li, X. Z., L. Zhang, and H. Nikaido.** 2004. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2415–2423.
- [70] **Li, X., F. Liu, Y. Hu, and K. Mi.** 2014. Draft genome sequence of mc²51, a highly hydrogen peroxide-resistant *Mycobacterium smegmatis* mutant strain. *Genome Announc.* **2**:e00092–14. doi: 10.1128.
- [71] **Liu, J., H. E. Takiff, and H. Nikaido.** 1996. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **178**:3791–3795.
- [72] **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods.* **25**:402–408.
- [73] **Locher, K. P., and E. Borths.** 2004. ABC transporter architecture and mechanism: implications from the crystal structures of BtuCD and BtuF. *FEBS Lett.* **564**:264–268.
- [74] **Lomovskaya, O., A. Lee, K. Hoshino, H. Ishida, A. Mistry, M. S. Warren, E. Boyer, S. Chamberland, and V. J. Lee.** 1999. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1340–1346.
- [75] **Louw, G. E., R. M. Warren, N. C. Gey van Pittius, C. R. McEvoy, P. D. Van Helden, and T. C. Victor.** 2009. A balancing act: efflux/influx in mycobacterial drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3181–3189.
- [76] **Machado, D., I. Couto, J. Perdigão, L. Rodrigues, I. Portugal, P. Baptista, B. Veigas, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2012. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS One.* **7**:e34538. doi: 10.1371.
- [77] **Machado, D., R. Cannalire, S. S. Costa, G. Manfroni, O. Tabarrini, V. Cecchetti, I. Couto, M. Viveiros, and S. Sabatini.** 2015. Boosting effect of 2-phenylquinoline efflux inhibitors in combination with macrolides against

Mycobacterium smegmatis and *Mycobacterium avium*. ACS Infect. Dis. *In press*.
doi: 10.1021.

- [78] **Martins, M., M. P. McCusker, M. Viveiros, I. Couto, S. Fanning, J. M. Pagès, and L. Amaral.** 2013. A simple method for assessment of MDR bacteria for over-expressed efflux pumps. *Open Microbiol. J.* **7**:72–82.
- [79] **McGinni, S., and T. L. Madden.** 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **32**:W20–W25.
- [80] **Milano, A., M. R. Pasca, R. Provvedi, A. P. Lucarelli, G. Manina, A. L. Ribeiro, R. Manganelli, and G. Riccardi.** 2009. Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system. *Tuberculosis (Edinb).* **89**:84–90.
- [81] **Mishra, M. N., and L. Daniels.** 2013. Characterization of the MSMEG_2631 gene (*mmp*) encoding a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family protein in *Mycobacterium smegmatis* and exploration of its polyspecific nature using biologic phenotype microarray. *J. Bacteriol.* **195**:1610–1621.
- [82] **Morris, R. P., L. Nguyen, J. Gatfield, K. Visconti, K. Nguyen, D. Schnappinger, S. Ehrt, Y. Liu, L. Heifets, J. Pieters, G. Schoolnik, and C. J. Thompson.** 2005. Ancestral antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**:12200–12205.
- [83] **Müller B., S. Dürr, S. Alonso, J. Hattendorf, C. J. Laisse, S. D. Parsons, P. D. Van Helden, and J. Zinsstag.** 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerg. Infect. Dis.* **19**:899–908.
- [84] **Nuermberger, E., and J. Grosset.** 2004. Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of mycobacterial infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:243–255.
- [85] **Oldham, M. L., A. L. Davidson, and J. Chen.** 2008. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**:726–733.

- [86] **Omote, H., M. Hiasa, T. Matsumoto, M. Otsuka, and Y. Moriyama.** 2006. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**: 587–593.
- [87] **Organização Mundial de Saúde (OMS).** 2010. Treatment of tuberculosis: Guidelines. 4^a ed. Genebra, Suíça.
- [88] **Organização Mundial de Saúde (OMS).** 2015. Global tuberculosis report 2015. 20^a ed. Genebra, Suíça.
- [89] **Pagès, J. M., and L. Amaral.** 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**:826–833.
- [90] **Paixão, L., L. Rodrigues, I. Couto, M. Martins, P. Fernandes, C. C. De Carvalho, G, A. Monteiro, F. Sansonetty, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2009. Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*. *J. Biol. Eng.* **3**:18. doi: 10.1186/1754-1611-3-18.
- [91] **Pasca, M. R., P. Guglierame, F. Arcesi, M. Bellinzoni, E. De Rossi, and G. Riccardi.** 2004. Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:3175–3178.
- [92] **Pasca, M. R., P. Guglierame, E. De Rossi, F. Zara, and G. Riccardi.** 2005. *mmpL7* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4775–4777.
- [93] **Patole, J., U. Sandbhor, S. Padhye, D. N. Deobagkar, C. E. Anson, and A. Powell.** 2003. Structural chemistry and in vitro antitubercular activity of acetylpyridine benzoyl hydrazone and its copper complex against *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**:51–55.
- [94] **Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996a. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**:575–608.
- [95] **Paulsen, I. T., R. A. Skurray, R. Tam, M. H. Saier Jr., R. J. Turner, J. H. Weiner, E. B. Goldberg, and L. L. Grinius.** 1996b. The SMR family: a novel

family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* **19**:1167–1175.

- [96] **Petrini, B.** 2006. Non-tuberculous mycobacterial infections. *Scand. J. Infect. Dis.* **38**:246–255.
- [97] **Piddock, L. J. V.** 2006a. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:382–402.
- [98] **Piddock, L. J. V.** 2006b. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:629–636.
- [99] **Pieroni, M., B. Wan, S. Cho, S. G. Franzblau, and G. Costantino.** 2014. Design, synthesis and investigation on the structure-activity relationships of N-substituted 2-aminothiazole derivatives as antitubercular agents. *Eur. J. Med. Chem.* **72**:26–34.
- [100] **Pieroni, M., B. Wan, V. Zuliani, S. G. Franzblau, G. Costantino, and M. Rivara.** 2015a. Discovery of antitubercular 2,4-diphenyl-1H-imidazoles from chemical library repositioning and rational design. *Eur. J. Med. Chem.* **100**:44–49.
- [101] **Pieroni, M., D. Machado, E. Azzali, S. S. Costa, I. Couto, G. Costantino, and M. Viveiros.** 2015b. Rational design and synthesis of thioridazine analogues as enhancers of the antituberculosis therapy. *J. Med. Chem.* **58**:5842–5853.
- [102] **Pillai, S. K., R. C. Moellering, and G. Eliopoulos.** 2005. Antimicrobial combinations. p. 365–441 *In* V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*. 5^a ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- [103] **Poole, K.** 2000. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-positive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2595–2599.
- [104] **Poole, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**:20–51.
- [105] **Poole, K.** 2008. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbe.* **3**:179–185.

- [106] **Ramón-García, S., C. Martín, J. A. Aínsa, and E. De Rossi.** 2006. Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*. J. Antimicrob. Chemother. **57**:252–259
- [107] **Ramón-García, S., C. Martín, E. De Rossi, and J. A. Aínsa.** 2007. Contribution of the Rv2333c efflux pump (the Stp protein) from *Mycobacterium tuberculosis* to intrinsic antibiotic resistance in *Mycobacterium bovis* BCG. J. Antimicrob. Chemother. **59**:544–547.
- [108] **Ramón-García, S., C. Martín, C. J. Thompson, and J. A. Aínsa.** 2009. Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth. Antimicrob. Agents Chemother. **53**:3675–3682.
- [109] **Rao, S., P., S. Alonso, L. Rand, T. Dick, and K. Pethe.** 2008. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **105**:11945–11950.
- [110] **Rodrigues, L., D. Wagner, M. Viveiros, D. Sampaio, I. Couto, M. Vavra, W. V. Kern, and L. Amaral.** 2008. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. J. Antimicrob. Chemother. **61**:1076–1082.
- [111] **Rodrigues, L., J. Ramos, I. Couto, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2011. Ethidium bromide transport across *Mycobacterium smegmatis* cell-wall: correlation with antibiotic resistance. BMC Microbiol. **11**:35. doi: 10.1186/1471-2180-11-35.
- [112] **Rodrigues, L., D. Machado, I. Couto, L. Amaral, and M. Viveiros.** 2012. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Infect. Genet. Evol. **12**:695–700.
- [113] **Rodrigues, L., C. Villellas, R. Bailo, M. Viveiros, and J.A. Aínsa.** 2013. Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. **57**:751–757.

- [114] **Roy, S. K., S. Pahwa, H. Nandanwar, and S. M. Jachak.** 2012. Phenylpropanoids of *Alpinia galanga* as efflux pump inhibitors in *Mycobacterium smegmatis* mc²155. *Fitoterapia*. **83**:1248–1255.
- [115] **Roy, S. K., N. Kumari, S. Gupta, S. Pahwa, H. Nandanwar, and S. M. Jachak.** 2013. 7-Hydroxy-(E)-3-phenylmethylene-chroman-4-one analogues as efflux pump inhibitors against *Mycobacterium smegmatis* mc²155. *Eur. J. Med. Chem.* **66**:499–507.
- [116] **Rue-Albrecht, K. D. A. Magee, K. E. Killick, N. C. Nalpas, S. V. Gordon, and D. E. MacHugh.** 2014. Comparative functional genomics and the bovine macrophage response to strains of the *Mycobacterium* genus. *Front. Immunol.* **5**:536. doi: 10.3389/fimmu.2014.00536.
- [117] **Saier Jr., M. H., J. T. Beatty, A. Goffeau, K. T. Harley, W. H. Heijne, S. C. Huang, D. L. Jack, P. S. Jähn, K. Lew, J. Liu, S. S. Pao, I. T. Paulsen, T. T. Tseng, and P. S. Virk.** 1999. The major facilitator superfamily. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:257–279.
- [118] **Sakamoto, K.** 2012. The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Vet. Pathol.* **49**:423–439.
- [119] **Sander, P., E. De Rossi, B. Böddinghaus, R. Cantoni, M. Branzoni, E. C. Böttger, H. Takiff, R. Rodriguez, G. Lopez, and G. Riccardi.** 2000. Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**:19–23.
- [120] **Schindler, B. D., P. Jacinto, and G. W. Kaatz.** 2013. Inhibition of drug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: current status of potentiating existing antibiotics. *Future Microbiol.* **8**:491–507.
- [121] **Sexton, P., and A. C. Harrison.** 2008. Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. *Eur. Respir. J.* **31**:1322–1333.
- [122] **Shinnick, T. M., and R. C. Good.** 1994. Mycobacterial taxonomy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**:884–901.
- [123] **Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, and D. G.**

- Higgins.** 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**:539. doi: 10.1038.
- [124] **Silva, P. E., F. Bigi, M. P. Santangelo, M. I. Romano, C. Martín, A. Cataldi, and J. A. Aínsa.** 2001. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:800–804.
- [125] **Singh, A. K., and J. M. Reyrat.** 2009. Laboratory maintenance of *Mycobacterium smegmatis*. *Curr. Protoc. Microbiol.* Chapter 10:Unit10C.1. John Wiley & Sons, Inc.
- [126] **Snapper, S. B., R. E. Melton, S. Mustafa, T. Kieser, and W. R. Jacobs Jr.** 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**:1911–1919.
- [127] **Sun, J., Z. Deng, and A. Yan.** 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **453**:254–267.
- [128] **Takiff, H. E., M. Cimino, M. C. Musso, T. Weisbrod, R. Martinez, M. B. Delgado, L. Salazar, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs Jr.** 1996. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**:362–366.
- [129] **Taneja, N. K., and J. S. Tyagi.** 2007. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**:288–293.
- [130] **Tegos G. P., M. Haynes, J. J. Strouse, M. M. Khan, C. G. Bologa, T. I. Oprea, and L. A. Sklar.** 2011. Microbial efflux pump inhibition: tactics and strategies. *Curr. Pharm. Des.* **17**:1291–1302.
- [131] **Tekaia, F., S. V. Gordon, T. Garnier, R. Brosch, B. G. Barrell, and S. T. Cole.** 1999. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tuber. Lung Dis.* **79**:329–342.

- [132] **Tortoli, E.** 2009. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**:906–910.
- [133] **Tortoli, E.** 2014. Microbiological features and clinical relevance of new species of the genus *Mycobacterium*. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**:727–752.
- [134] **Untergrasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, and S. G. Rozen.** 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**:e115. Epub 2012 Jun 22.
- [135] **Van Veen, H. W., K. Venema, H. Bolhuis, I. Oussenko, J. Kok, B. Poolman, A. J. Driessen, and W. N. Konings.** 1996. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**:10668–10672.
- [136] **Vila, J., S. Martí, and J. Sánchez-Céspedes.** 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:1210–1215.
- [137] **Viveiros, M., C. Leandro, and L. Amaral.** 2003. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**:274–278.
- [138] **Viveiros, M., A. Jesus, M. Brito, C. Leandro, M. Martins, D. Ordway, A. M. Molnar, J. Molnar, and L. Amaral.** 2005. Inducement and reversal of tetracycline resistance in *Escherichia coli* K-12 and expression of proton gradient-dependent multidrug efflux pump genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:3578–3582.
- [139] **Viveiros, M., M. Martins, I. Couto, L. Rodrigues, G. Spengler, A. Martins, J. E. Kristiansen, Molnar, J. Molnar, and L. Amaral.** 2008. New methods for the identification of efflux mediated MDR bacteria, genetic assessment of regulators and efflux pump constituents, characterization of efflux systems and screening for inhibitors of efflux pumps. *Curr. Drug. Targets.* **9**:760–778.

- [140] **Viveiros, M., L. Rodrigues, M. Martins, I. Couto, G. Spengler, A. Martins, and L. Amaral.** 2010. Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system. *Methods Mol. Biol.* **642**:159–172.
- [141] **Viveiros, M., M. Martins, L. Rodrigues, D. Machado, I. Couto, J. Ainsa, and L. Amaral.** 2012. Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **10**:983–998.
- [142] **Warren, R. M., N. C. Gey Van Pittius, M. Barnard, A. Hesselning, E. Engelke, M. De Kock, M. C. Gutierrez, G. K. Chege, T. C. Victor, E. G. Hoal, and P. D. Van Helden.** 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **10**:818–822.
- [143] **Weinstein E. A., T. Yano, L.-S. Li, D. Avarbock, A. Avarbock, D. Helm, A. A. McColm, K. Duncan, J. T. Lonsdale, and H. Rubin.** 2005. Inhibitors of type II NADH: menaquinone oxidoreductase represent a class of antitubercular drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**: 4548–4553.
- [144] **Winthrop, K. L., E. McNelley, B. Kendall, A. Marshall-Olson, C. Morris, M. Cassidy, A. Saulson, and K. Hedberg.** 2010. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**:977–982.
- [145] **Yan, N.** 2013. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem. Sci.* **38**:151–159.
- [146] **Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. Madden.** 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* **13**:134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.
- [147] **Yu, E. W., J. R. Aires, and H. Nikaido.** 2003. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J. Bacteriol.* **185**:5657–5664.

- [148] **Zechini, B., and I. Versace.** 2009. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **4**:37–50.
- [149] **Zumla, A., P. Nahid, and S. T. Cole.** 2013. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**:388–404.